



Isabel Cristina Ribau Fernandes Coutinho

Mestre em Tecnologias do Medicamento

A peroxidase do citocromo *c* de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617: aplicação de técnicas espectroscópicas e electroquímicas ao estudo do mecanismo de activação e catálise.

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Química Sustentável

Orientador: Doutora Sofia Rocha Pauleta, Cientista Convidada do
Laboratório Associado REQUIMTE

Doutora Patricia Mira Paes de Sousa Videira, Gestora de
Ciência e Tecnologia da FCT

Co-orientador: Doutor José João Galhardas de Moura, Professor
Catedrático Aposentado da FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Rendas

Arguente(s): Prof. Doutora Isabel Maria Andrade Martins Galhardas de Moura

Vogais: Prof. Doutora Margarida Maria Portela Correia dos Santos Romão

Prof. Doutor Francisco Jorge Fernandes Caldeira

Prof. Doutor Stephane Pierre Besson

Prof. Doutor Francisco Manuel Ferreira Gírio



Março 2013

2013

A peroxidase do citocromo c de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617: aplicação de técnicas espectroscópicas e electroquímicas ao estudo do mecanismo de activação e catálise.

Isabel Cristina Ribau Fernandes Coutinho





Isabel Cristina Ribau Fernandes Coutinho

Mestre em Tecnologias do Medicamento

A peroxidase do citocromo *c* de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617: aplicação de técnicas espectroscópicas e electroquímicas ao estudo do mecanismo de activação e catálise.

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Química Sustentável

Orientador: Sofia Pauleta, Cientista Convidade do
Laboratório Associado REQUIMTE, FCT-UNL e Patricia
Sousa, Gestora de Ciência e Tecnologia da FCT

Co-orientador: José Moura, Professor Catedrático, FCT-
UNL

A peroxidase do citocromo *c* de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617: aplicação de técnicas espectroscópicas e electroquímicas ao estudo do mecanismo de activação e catálise.

Copyright

Isabel Cristina Ribau Fernandes Coutinho

FCT/UNL

UNL

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

À Alice, à Catarina e à Beatriz

AGRADECIMENTOS

“Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton
(Cartas a R. Hooke)

Gostaria de começar por agradecer à Professora Isabel Moura e ao Professor João Moura a oportunidade de realizar um trabalho de investigação na área da Bioquímica e de usufruir de boas condições a nível laboratorial.

Às minhas orientadoras Sofia Pauleta e Patrícia Sousa agradeço os conhecimentos adquiridos e o tempo que disponibilizaram para a discussão de resultados.

A todos os que de algum modo me ajudaram a concretizar este trabalho, agradeço o empenho e a amizade.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que durante estes anos me acompanharam e encorajaram a continuar a trabalhar.

Por último um agradecimento especial às minhas três filhas, Alice, Catarina e Beatriz, que me apoiaram durante estes anos e a quem dedico este trabalho.

RESUMO

As peroxidases do citocromo *c* bacterianas catalisam a redução do peróxido de hidrogénio a água. A sua estrutura, activação e os mecanismos de desintoxicação de peróxido de hidrogénio tem sido alvo de estudos desde os anos noventa do século XX. Estas enzimas existem numa grande variedade de organismos, tanto aeróbios como anaeróbios e protegem-os do *stress oxidativo*.

Este trabalho teve como principal objectivo o aprofundamento do conhecimento do mecanismo de activação e catálise da peroxidase do citocromo *c* (PCc) da bactéria marinha *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Pretendeu-se compreender melhor os factores de que depende a activação da enzima, e que alterações estruturais provocam. Também se pretendeu conhecer melhor os mecanismos que regem a transferência de electrões no meio biológico, tendo-se centrado este estudo na transferência de electrões entre a PCc e o seu parceiro fisiológico o citocromo *c*₅₅₂. Analisou-se o comportamento electroquímico da PCc com eléctrodos com filme de proteína e de membrana e utilizaram-se técnicas espectroscópicas.

Iniciou-se o trabalho investigando as condições que permitem à bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*, sobreexpressar a peroxidase do citocromo *c*. Esta optimização permitiu confirmar que o FNR regula a expressão do gene *ccp* que codifica para esta enzima. Caracterizou-se a PCc e investigou-se o seu mecanismo de activação, o qual exhibe características de efeito redox-Bohr. Estudou-se também a cinética da transferência electrónica intermolecular durante a catálise da peroxidase do citocromo *c* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂, obtendo-se uma constante intermolecular, *k*, de $(8,0 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Investigou-se ainda a influência de condições experimentais como o pH ou a força iónica na catálise mediada. Os resultados obtidos nas diferentes condições foram analisados com base em parâmetros termodinâmicos e cinéticos, tais como potenciais formais e constantes de velocidades de transferência intermolecular. Usando técnicas electroquímicas obteve-se um $\text{p}K_{a1}$ de $5,8 \pm 0,1$ e um $\text{p}K_{a2}$ de $7,5 \pm 0,1$, usando técnicas espectroscópicas $\text{p}K_{a1}$ de $5,5 \pm 0,1$ e um $\text{p}K_{a2}$ de $8,5 \pm 0,1$. Esta diferença de resultados foi atribuída às diferentes condições experimentais iniciais usadas em cada técnica. A análise dos resultados do estudo da actividade catalítica com a força iónica mostrou que o complexo entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂ tem natureza hidrofóbica. Com base nas estruturas da PCc e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, usando o algoritmo computacional BiGGER e o programa Chemera, bem como dados de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, propôs-se uma estrutura para o complexo de transferência electrónica entre as duas proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: Peroxidase do citocromo *c*, Mecansimo de activação, Citocromo *c*₅₅₂, Catálise mediada, Complexo de transferência electrónica.

ABSTRACT

Since the nineties of the twenty century, the structure, activation and hydrogen peroxide detoxification mechanism of bacterial cytochrome *c* peroxidase have been studied. These cytochrome *c* peroxidase are important in cellular detoxification in bacteria by catalyzing the reduction of hydrogen peroxide to water, they protect the bacterium from *oxidative stress* and its ubiquity reflects its importance.

The main aim of this work was to investigate the activation mechanism and catalysis of cytochrome *c* peroxidase from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, a marine bacterium, to improve the knowledge on dihemic cytochrome *c* peroxidase. With the objective of better understanding the mechanisms governing the electron transfers in biological system, we have investigated the electron transfer between the cytochrome *c* peroxidase and its physiological partner cytochrome *c*₅₅₂.

The growth conditions of *Ma. hydrocarbonoclasticus* were optimized in order to obtain large amounts of cytochrome *c* peroxidase (CCP). This optimization led to the confirmation that FNR regulates the *ccp* gene expression which codifies for CCP in this bacteria. The spectroscopic characterization was described and activation mechanism was investigated. This mechanism involves a redox-Bohr effect. The electrochemical behaviour of CCP was analyzed with the proteins adsorbed in the electrode surface (protein film) or entrapped in a membrane electrode. The kinetics of intermolecular electron transfer during the catalysis of cytochrome *c* peroxidase mediated by cytochrome *c*₅₂₂ was also investigated and a intermolecular constant, *k*, was obtained $(8,0 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. The influences of experimental conditions such as the pH or ionic strength was studied by electrochemical and spectroscopic techniques. The results obtained in the different conditions were evaluated on the basics of thermodynamic and kinetic parameters. Using electrochemical techniques a $\text{p}K_{\text{a}1}$ of $5,8 \pm 0,1$ and a $\text{p}K_{\text{a}2}$ of $7,5 \pm 0,1$ was obtained and using spectroscopic techniques the values were $\text{p}K_{\text{a}1}$ of $5,5 \pm 0,1$ and a $\text{p}K_{\text{a}2}$ of $8,5 \pm 0,1$. These differences were attributed to the inicial experimental conditions of these techniques. The analyses of the results revealed that cytochrome *c*₅₅₂ binds to CCP mainly by hydrofobic interactions.

Based on CCP and cytochrome *c*₅₅₂ PDB structures, using the computer algorithm BiGGER and program Chemera, putative structures for the complex electron transfer between the two proteins were obtained.

KEYWORDS: Cytochrome *c* Peroxidase, Activation mechanism, Cytochrome *c*₅₅₂, Mediated catalysis, Electron transfere complex .

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
PALAVRAS - CHAVE	V
ABSTRACT	VII
KEY-WORDS	VII
ÍNDICE GERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XXV
LISTA DE ABREVIATURAS	XXIX
LISTA DE SÍMBOLOS	XXXI

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	1
1.1 As espécies reactivas de oxigénio e o <i>stress</i> oxidativo <i>in vivo</i>	2
1.2 As peroxidases do citocromo <i>c</i> bacterianas	5
1.2.1 Regulação da expressão génica das peroxidases do citocromo <i>c</i> bacterianas	5
<i>i) O regulador da activação transcripcional FNR</i>	6
<i>ii) O regulador da activação transcripcional OxyR</i>	6
1.2.2 Regulação genética de peroxidases do citocromo <i>c</i> nas bactérias gram-negativas	7
1.2.3 Alinhamento da sequência primária de peroxidases do citocromo <i>c</i> dihémicas	9
1.2.4 Estrutura das peroxidases do citocromo <i>c</i> dihémicas	10
1.2.5 Caracterização bioquímica	15
1.2.6 Espectroscopia de UV-visível	17
1.2.7 Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE)	18
1.2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹ H-RMN)	19
1.2.9 O mecanismo de activação	21
1.2.10 A catálise enzimática	23
1.2.11 Inactivação de peroxidases pelo peróxido de hidrogénio	25
1.3 Complexos de transferência electrónica - peroxidases do citocromo <i>c</i> e citocromos <i>c</i>	27
1.3.1 O citocromo <i>c</i> ₅₅₂ de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	28

1.3.2 O citocromo <i>c</i> de cavalo	29
1.3.3 Complexos formados entre peroxidases do citocromo <i>c</i> e parceiros redox	30
1.4 Âmbito do trabalho	33
CAPÍTULO 2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Crescimento da bactéria <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 617	36
2.1.1 O microrganismo	36
2.1.2 Preparação do meio de cultura líquido e sólido	36
2.1.3 Condições de crescimento	37
2.2 Purificação das proteínas de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i>	40
2.2.1 Preparação de esferoplastos	40
2.2.2 Purificação da peroxidase do citocromo <i>c</i>	41
2.2.3 Purificação do citocromo <i>c</i> ₅₅₂ de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	42
2.3 Electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	42
2.4 Determinação da concentração das proteínas	43
2.5 Determinação da massa molecular aparente por cromatografia de exclusão molecular	43
2.5.1 Estudo da influência da concentração de PCc na sua massa molecular aparente	44
2.5.2 Estudo da influência dos iões cálcio na massa molecular aparente de PCc	44
2.5.3 Estudo do efeito da força iónica na massa molecular aparente de PCc	44
2.6 Caracterização espectroscópica	44
2.6.1 Espectroscopia de UV-visível	44
2.6.1.1 Estudo da activação da PCc	44
2.6.1.2 Catálise em estado estacionário mediada pelo citocromo <i>c</i> ₅₅₂ - ensaio espectrofotométrico	45
i) <i>Preparação das proteínas</i>	45
ii) <i>Ensaio de actividade</i>	45
2.6.2 Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE)	47
2.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹ H-RMN)	48

<i>i) Preparação da amostra de PCc e aquisição de dados</i>	48
<i>ii) Estudo da interacção entre a PCc e o citocromo c_{552}</i>	48
<i>iii) Determinação da constante de dissociação do complexo PCc-citocromo c_{552} por espectroscopia de ^1H-RMN</i>	48
2.7 Titulações potenciométricas: determinação do potencial formal de oxidação-redução	49
2.7.1 Calibração do eléctrodo combinado (platina, Ag/AgCl)	49
2.7.2 Titulação potenciométrica	50
2.7.2.1 Determinação dos potenciais formais por potenciometria	51
2.8 Métodos electroquímicos	52
2.8.1 Voltametria cíclica	53
2.8.2 Voltametria de impulso diferencial	53
2.8.3 Preparação do eléctrodo	54
2.8.4 Electrólito de suporte e soluções de trabalho	55
<i>i) Peroxidase do citocromo c de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i></i>	55
<i>ii) Citocromo c_{552} de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i></i>	55
<i>iii) Determinação do coeficiente de difusão do citocromo c_{552} de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i></i>	55
<i>iv) Variação do pH</i>	56
<i>v) Variação da força iónica</i>	56
<i>vi) Ensaio em presença de PCc</i>	57
2.8.5 Estudo cinético da catálise medida	57
<i>i) Variação da concentração do peróxido de hidrogénio</i>	57
<i>ii) Variação da concentração de PCc</i>	57
2.8.6 Influência do pH na catálise mediada	58
2.8.7 Influência da força iónica na catálise mediada	58
<i>i) Adição de NaCl à solução de trabalho e ao electrólito</i>	58
<i>ii) Adição de NaCl ao electrólito</i>	58
2.9 Simulações de atracamento molecular	58

CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO DA PEROXIDASE DO CITOCROMO <i>c</i> DE <i>MARINOBACTER HYDROCARBONOCLASTICUS</i>	61
3.1 Optimização das condições de crescimento da bactéria <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> para a produção de PCc	62
3.2 Purificação da peroxidase do citocromo <i>c</i> e do citocromo <i>c</i>₅₅₂	64
3.3 Determinação da massa molecular aparente da peroxidase do citocromo <i>c</i> e do citocromo <i>c</i>₅₅₂ de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i>	66
3.4 Caracterização espectroscópica da peroxidase do citocromo <i>c</i>	68
3.4.1 Espectroscopia de UV-visível	68
3.4.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	74
3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (¹ H-RMN)	77
3.5 Determinação dos potenciais formais por potenciometria	80
3.6 Estudos por voltametria utilizando eléctrodos de grafite pirolítica com filme de proteína	85
3.6.1 Voltametria cíclica	85
3.6.2 Voltametria de impulso diferencial	89
3.6.3 Catálise directa	93
i) Voltametria de impulso diferencial	93
ii) Voltametria cíclica	94
3.7 Estudos por voltametria de impulso diferencial utilizando eléctrodos de membrana de grafite pirolítica	96
3.8 Conclusão	97
CAPÍTULO 4 CATÁLISE DA PEROXIDASE DO CITOCROMO <i>c</i> MEDIADA PELO CITOCROMO <i>c</i>₅₅₂ DE <i>MARINOBACTER HYDROCARBONOCLASTICUS</i>	103
4.1 Caracterização da cinética de transferência electrónica, por electroquímica	104
4.2 Caracterização da interacção entre a peroxidase do citocromo <i>c</i> e o citocromo <i>c</i>₅₅₂ de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	111
4.2.1 Efeito da presença de peroxidase do citocromo <i>c</i> no sinal do citocromo <i>c</i> ₅₅₂	111
4.2.2 Catálise da peroxidase do citocromo <i>c</i> mediada pelo citocromo <i>c</i> ₅₅₂	113
4.2.3 Efeito do pH na catálise mediada	121
4.2.4 Efeito da força iónica na catálise mediada	123

4.2.4.1 Diferente metodologia para a preparação da solução de trabalho	123
4.2.4.2 Efeito da força iónica na catálise a diferentes valores de pH	126
4.3 Caracterização da cinética de estado estacionário seguida por ensaios espectrofotométricos	129
4.3.1 Efeito da concentração de peroxidase do citocromo <i>c</i>	129
4.3.2 Efeito do pH na actividade do centro catalítico	130
4.3.3 Efeito da força iónica na catálise mediada	132
4.4 Conclusão	135
CAPÍTULO 5 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA ENTRE A PEROXIDASE DO CITOCROMO <i>c</i> E O CITOCROMO <i>c</i>₅₅₂ DE <i>MARINOBACTER HYDROCARBONOCLASTICUS</i>	139
5.1 Interacção peroxidase do citocromo <i>c</i>: citocromo <i>c</i>₅₅₂	140
5.2 Modelo estrutural do complexo PCc: Cit <i>c</i>₅₅₂	144
5.2.1 As estruturas da PCc (proteína alvo) e dos citocromos <i>c</i> (sondas)	144
5.2.2 Simulações de atracamento molecular	147
<i>i) Complexo citocromo <i>c</i>₅₅₂ e PCc de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i></i>	148
<i>ii) Complexo citocromo <i>c</i> de cavalo e PCc de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i></i>	153
5.3 Conclusão	156
CAPÍTULO 6 CONCLUSÃO	159
6.1 Conclusão final	160
6.2 Perspectivas futuras	164
BIBLIOGRAFIA	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Sequência de ADN (NCBI Sequence Referência: NC_017067.1) do gene *ccp* (VIMSS3521861: Maqu-0372 citocromo *c* peroxidase 349 a.a.) da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (140 bases a montante, 1050 pares de base (gene *ccp* a negrito), 50 bases a jusante do gene *ccp*-Maug) onde se destaca a sequência de bases nucleicas reconhecida pelo FNR. A montante do gene *ccp*, encontra-se a sequência de resíduos reconhecidos pelo regulador FNR, que está assinalada por uma caixa (dados retirados de www.microbesonline.org, acedido a 1 de Fevereiro 2013).

Figura 1.2 Esquema da organização do sistema de maturação de citocromos tipo *c* (Ccm) na membrana citoplasmática e da translocação do hemo em bactérias Gram-negativas [112, 113]. O pré-apo-citocromo é transferido do citoplasma para o periplasma translocador SecYEG (sistema de transporte secretor) e o grupo hemo pelo sistema de transporte complexo CcmABC, CcmD e CcmE. A incorporação do hemo no apo-citocromo ocorre em CcmF, usando electrões transferidos pela proteína transmembranar DsbD (oxidoreductase dissulfureto). Os sistemas CcmG e CcmH libertam o citocromo para o periplasma [112, 113]. O sistema de maturação de citocromo tipo *c*, Ccm, é constituído por proteínas membranares ou que estão ligadas à membrana (CcmABCDEFGH e DsbD). As setas são caminhos do sistema de maturação. Figura adaptada da referência 113, 114 e 119.

Figura 1.3 Sequência de aminoácidos da PCc de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840, onde se destaca o péptido-sinal (caixa cinzenta). Previsão obtida em <http://www.signalP.4.1> [120].

Figura 1.4 Alinhamento da sequência primária das peroxidases do citocromo *c* bacterianas mais estudadas: *Pa*, *Ps. aeruginosa*, *Pp*, *Pa. pantotrophus*, *Mh*, *Ma. hydrocarbonoclasticus*, *Ps*, *Ps. stutzeri*, *Rc*, *Rb. capsulatus*, *Gs*, *Gb. sulfurreducens*, *So*, *Sw. oneidensis* e *Ne*, *Ni. europaea*. Os aminoácidos ligados aos hemos (CXXCH) estão indicados como hemo E (C-terminal) e hemo P (N-terminal). A cor cinzenta estão assinalados os aminoácidos conservados e a vermelho os semi-conservados. (▲) Ligandos H (histidina) e M (metionina) ao ferro hémico, (△) resíduos de cisteína covalentemente ligados ao hemo, (●) ligandos do ião cálcio. Figura adaptada das referências [65, 71, 75, 77 e 97].

Figura 1.5 Estruturas da peroxidase do citocromo *c* de *Ps. aeruginosa* na forma oxidada (A) [PDB ID: 1EB7] e no estado de valência mista (B) [PDB ID: 2VHD] e de *Ni. Europaea* (C) oxidada [PDB ID: 1IQC]. HE-hemo de transferência electrónica, HP-hemo peroxidático, esfera verde- ião cálcio. As PCc contêm dois domínios helicoidais, com um hemo tipo *c* covalentemente ligado via ligações tioeter a um motivo conservado CisXXCisHis. O hemo P está no domínio N-terminal e tem a coordenação bis-histidina, enquanto o grupo hémico ligado ao C-terminal tem a coordenação metionina-histidina. Figuras preparadas com o software Accelrys Viewerlite.

Figura 1.6 Posição do hemo E, do hemo P e do triptofano 97, bem como do ião cálcio na estrutura cristalina de *Rb. capsulatus*. A distância entre os ferros hémicos é aproximadamente 20 Å e a distância entre os grupos propionatos é de 10 Å. Os grupos propionatos encontram-se circundados e o triptofano 97 identificado. Figura retirada da referência 65.

Figura 1.7 Sobreposição de estruturas de PCc bacterianas. A cor verde apresenta-se a estrutura da PCc na forma oxidada de *Rb. capsulatus* (1ZZH) a cor vermelha a estrutura da PCc de *Ps. aeruginosa* na forma oxidada (1EB7) e a azul a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma oxidada (1RZ6). Circundado a preto encontra-se o loop 3. Figura retirada de referência 65.

Figura 1.8 Estrutura da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na (A) forma fechada e sem cálcio a pH 4,0 [PDB: IRZ6] e (B) forma aberta com cálcio a pH 5,3 [PDB: IRZ5], onde se mostra a ampliação da cavidade entre os domínios da PCc. Cada hemo está localizado num domínio (C ou N-terminal); o triptofano e o cálcio (esfera verde na estrutura e a rosa na ampliação) estão localizados na interface hidrofóbica entre os dois domínios. Na forma fechada (A) o hemo P apresenta uma coordenação bis-His, estando a cavidade entre os domínios ocupada por uma molécula de água (a vermelho) coordenada com quatro moléculas de água e três resíduos (treonina, aspergina e prolina); o hemo E apresenta uma coordenação Met-His. Na forma aberta (B) o hemo P apresenta-se penta coordenado e o hemo E apresenta-se hexacoordenado com uma coordenação Met-His e o ião cálcio encontra-se coordenado com quatro moléculas de água e três resíduos (treonina, aspergina e prolina). Em (B) indicam-se os *loops* 1 (aminoácidos 80-92, circundado a azul), 2 (aminoácidos 105-132, circundado a amarelo) e 3 (aminoácidos 225-257, circundado a verde) que encontram-se circundados, bem como o hemo (HE- hemo de transferência de electrões; HP- hemo peroxidáctico) e o ião cálcio (esfera verde). Asp-ácido aspártico, Asn-aspargina, Thr-treonina, Pro-prolina. As figuras da estrutura tridimensional da PCc foram preparadas com Accelrys Viewerlite e as ampliações (imagens do lado esquerdo) foram retiradas da referência 71.

Figura 1.9 (A) Espectro de absorção da PCc de *Pa. pantotrophus* oxidada (Ox.) e completamente reduzida (Red). (B) Espectro de absorção da enzima (i) oxidada, (ii) após a adição de ascorbato de sódio (PCc em valência mista) e (iii) após a adição de CaCl₂. Espectros retirados da referência [46].

Figura 1.10 Espectro de RPE da PCc de *Pa. pantotrophus* (337 µM) oxidada e a vários tempos após a incubação com ascorbato de sódio em tampão fosfato 1 mM (pH 7) com NaCl 10mM, à temperatura de 8 K. Espectros retirados da referência [46].

Figura 1.11 Espectro de ¹H-RMN da PCc de *Pa. pantotrophus* nas forma oxidada (a) e em valência mista (b), na ausência de cálcio. Espectros retirados da referência [46].

Figura 1.12 Comparação das estruturas de PCc no estado inactivo (verde) e das estruturas no estado activo (azul), focando os resíduos que envolvem o hemo E e que envolvem o hemo P. A PCc de *Ps. aeruginosa* está representada a verde tal como é isolada (forma inactiva) (código do PDB: 1EB7) e a azul representa-se a PCc de *Ni. europaea* como é isolada (forma activa) (código do PDB: 1IQC). O *loop* 3 encontra-se circundado a preto. Figura retirada da referência 59.

Figura 1.13 Estrutura da PCc de *Ni. europaea* como é isolada (forma activa) (código do PDB: 1IQC), onde se identificam os *loops* 1 (aminoácidos 80-92, circundado a vermelho), 2 (aminoácidos 105-132, circundado a amarelo) e 3 (aminoácidos 225-257, circundado a verde) que encontram-se circundados, bem como o hemo (HE-hemo de transferência de electrões; HP-hemo peroxidáctico) e o ião cálcio (esfera verde). Figura preparada com Accelrys Viewerlite.

Figura 1.14 Esquema da activação e do mecanismo do ciclo catalítico de PCc bacterianas, onde se apresenta a regeneração do citocromo *c* durante a catálise do peróxido de hidrogénio. (Esquema adaptado das seguintes referências [41, 42, 49, 58, 65, 71 e 76]). E-hemo de transferência electrónica, P- hemo catalítico, SA- spin alto, SB- spin baixo e SA/SB- equilíbrio de spins.

Figura 1.15 Mecanismos de inactivação de PCc, proposto a partir do composto IV. Reacção (1): conversão do composto IV no composto VI, na presença de excesso de peróxido de hidrogénio. São possíveis três caminhos de decomposição do composto VI: (2) reacção com o tetrapirrol, oxidando a porfirina e libertando o ião ferro; (3) regresso ao estado inicial (composto V, Figura 1.14); (4) o peróxido de hidrogénio é o doador de electrões, originando um radical

peróxido e a regeneração do hemo ao estado inicial (composto V, Figura 1.14). Retirado da referência 157.

Figura 1.16 Esquema do mecanismo de inactivação de peroxidases, onde se apresenta a regeneração do mediador *c* e a formação de espécies intermediárias durante a catálise do peróxido de hidrogénio mediada por peroxidases. O hemo catalítico, circundado, no final do processo de inactivação é novamente regenerado. Esquema adaptado da referência 158.

Figura 1.17 Estrutura do dímero do citocromo *c*₅₅₂ obtida a pH 5,6 (código PDB: CNO) tendo em conta a (A) estrutura secundária, (B) os pKa resíduos e (C) a os resíduos carregados da superfície. Em (C) a coloração azul representa as partes básicas carregadas positivamente na superfície da proteína e a vermelha representa as partes ácidas negativamente carregadas da superfície da proteína. Os hemos estão coloridos a cinzento e azul os ligando hémicos (His 18 e Met 60). Na estrutura circunda-se a zona do hemo exposta ao solvente. Figura preparada com Accelrys Viewerlite.

Figura 1.18 Estrutura do dímero do citocromo *c* de cavalo (código PDB: 1HRC) tendo em conta a (A) estrutura secundária, (B) os pKa resíduos e (C) a os resíduos carregados da superfície. Em (C) a coloração azul representa as partes básicas carregadas positivamente na superfície da proteína e a vermelha representa as partes ácidas negativamente carregadas da superfície da proteína. Os hemos estão coloridos a cinzento e azul os ligando hémicos (His 18 e Met 80). Na estrutura circunda-se a zona do hemo exposta ao solvente. Figura preparada com Accelrys Viewerlite.

Figura 2.1 Cultura da bactéria Gram-negativa *Ma. hydrocarbonoclasticus* em meio de cultura líquido, recolhido de um microfermentador de 10 L, após 3 horas de incubação. A morfologia típica desta bactéria (bastonetes) pode ser observada nesta imagem obtida com um microscópio óptico (ampliação de 1000 x/1.3 oil Ph3).

Figura 2.2 Esquema do microfermentador de 10 litros onde se efectuaram os crescimentos da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*.

Figura 2.3 Curva de crescimento da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*, obtida num fermentador de 10 L em que (—) representa a percentagem de oxigénio dissolvido registada ao longo do crescimento e (□) representa logaritmo da densidade óptica a 600 nm ao longo do tempo. Condições de crescimento: lactato 0,8 % (m/V), NaNO₃ 120 µM, pH 7,5, velocidade de arejamento 0,2 vvm. A velocidade de agitação foi de 150 rpm durante as primeiras 3 horas, sendo depois reduzida para 50 rpm, o crescimento foi realizado a 30° C durante 42 horas.

Figura 2.4 Esquema geral da purificação da peroxidase do citocromo *c* e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Os tampões indicados referem-se aos tampões de eluição dos diversos passos cromatográficos.

Figura 2.5 (A) Perfil de eluição das proteínas padrão a 280 nm eluídas com Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM e CaCl₂ 2 mM, numa coluna de exclusão molecular Superdex-200. Os padrões usados foram: ferritina (Fe), aldolase (Al), conalbumina (CA), anidrase carbónica (AC), ribonuclease (R) e aprotinina (AP). (B) Curva de calibração obtida a partir do perfil de eluição de (A); linearização do volume de eluição (V_e) em função da massa molecular aparente (MM), $V_e = -4,0 \text{ LogMM} + 21,4$ ($r = 0,99$).

Figura 2.6 Absorvância a 552 nm em função do tempo, obtida durante ensaios de actividade da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. As setas indicam o momento da adição de PCc, peróxido de hidrogénio e K₃Fe(CN)₆ à mistura reaccional. Inserção: linearização do logaritmo neperiano (ln) da diferença entre a absorvância a 552 nm (A) e a absorvância da mistura reaccional totalmente oxidada (A_{ox}), em função do tempo. A actividade do centro catalítico (*k*) é determinada pelo

produto do declive da recta (k') pela concentração do citocromo c e da PCc. Equação da recta ($\ln(A-A_{ox}) = -0,280 t - 2,44$, $r = 0,99$). Condições experimentais: citocromo c_{552} 7 μ M, peroxidase do citocromo c 24 nM, CaCl_2 1 mM, em tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), e peróxido de hidrogénio (100 μ M).

Figura 2.7 Esquema do modelo usado para simular as curvas de absorvância em função do potencial.

Figura 2.8 Esquema da célula electroquímica usada neste trabalho.

Figura 2.9 (A) e (B) Preparação do eléctrodo de membrana (EMGP), onde sobre a membrana de diálise (c), depositada em cima do anel de borracha (b) é colocada uma gota de solução de trabalho (d) com ajuda de uma micropipeta (f). (C) Esquema do eléctrodo de membrana: (a) eléctrodo de trabalho de grafite pirolítica; (b) anel de borracha; (c) membrana; (d) solução de proteína aprisionada, (e) grafite pirolítica. Junto da superfície do eléctrodo a proteína oxidada recebe electrões ficando reduzida.

Figura 3.1 Electroforese em condições desnaturantes do periplasma de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, obtido em diferentes condições de crescimentos, realizados para a optimização da produção de peroxidase do citocromo c em que foram adicionadas diferentes concentrações de nitrato de sódio ao meio de cultura. Gel de poliacrilamida (12,5%) com coloração para hemos tipo c . Nos géis foram aplicadas amostras em que a relação volume de periplasma bruto / volume da amostra aplicada no gel é igual. cd_1 - nitrito reductase, PCc - peroxidase do citocromo c .

Figura 3.2 (A) Espectros de UV-visível de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 3,1 μ M em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), no final da purificação (—) e na forma reduzida (---) após a adição de ditionito de sódio. (B) Electroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida (12,5%) corado com Azul de Coomassie; P- periplasma, 1- fracção de PCc que eluíu da coluna Source Q, 2- fracção de PCc que eluíu da coluna superdex 200, 3- fracção pura de PCc que eluíu da coluna HTP.

Figura 3.3 (A) Espectro de UV-visível do citocromo c_{552} 4,7 μ M em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,6). (—) Espectro do citocromo c_{552} puro e oxidado e (---) espectro do citocromo c reduzido. (B) Electroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida (12,5%) corado com azul de comassie, MM - padrões de massas moleculares. 1 - fracção de citocromo c_{552} que eluíu da Source Q, 2- fracção de citocromo c_{552} que eluiu da Superdex 75, 3 - fracção pura de citocromo c_{552} que eluíu da HTP.

Figura 3.4 Espectros de UV-visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, a pH 4,5 (A), 5,0 (B), 5,5 (C), 6,0 (D), 6,5 (E), 7,0 (F), 7,5 (G), 8,0 (H) e 8,5 (I). PCc oxidada (—); PCc de valência mista após 1 minuto (-·-·-) e 20 min (····) de incubação com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (5 μ M), PCc de valência mista após 1 minuto (—) e 40 minutos (—) de incubação na presença de excesso de cloreto de cálcio (1 mM). Foi utilizado o tampão acetato/ácido acético para pH 4,5 e 5,0, tampão MES para pH entre 5,5 e 6,5, HEPES para pH 7,0, 7,5 e 8,0 e Tris-HCl para pH 8,5.

Figura 3.5 Espectros de UV-visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, a pH 4,5 (A), 5,0 (B), 5,5 (C), 6,0 (D) e 6,5 (F). Espectros entre 360 nm e 480 nm e espectros entre 590 nm e 690 nm. PCc oxidada (—); PCc de valência mista após 1 minuto (-·-·-) e 20 min (····) de incubação com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (5 μ M), PCc de valência mista após 1 minuto (—) e 40 minutos (—) de incubação na presença de excesso de cloreto de cálcio (1 mM). Foi utilizado o tampão acetato/ácido acético para pH 4,5 e 5,0 e tampão MES para pH entre 5,5 e 6,5.

Figura 3.6 Espectro de UV-visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a pH 6,5 (A), 7,0 (B), 7,5 (C), 8,0 (D) e 8,5 (F). Espectro entre 360 nm a 480 nm e espectro de 590 nm e 690 nm. PCc oxidada (—); PCc de valência mista após 1 minuto (---) e 20 min (----) de incubação com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (5 µM), PCc de valência mista após 1 minuto (—) e 40 minutos (—) de incubação na presença de excesso de cloreto de cálcio (1 mM). Foi utilizado o tampão MES para pH 6,5, HEPES para pH 7,0, 7,5 e 8,0 e Tris- HCl para pH 8,5.

Figura 3.7 Espectros de RPE da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em Tris- HCl 10 mM (pH 7,5). No estado oxidado (A), no estado de valência mista (B) e no estado de valência mista incubada com excesso de ião cálcio (1 mM) (C). Simulação do espectro de RPE da PCc oxidada (A'), da forma de valência mista (B') e da forma de valência mista incubada com excesso de iões cálcio (C'). Condições experimentais: Frequência de micro-ondas 9,65 GHz; temperatura 8 K; número de varrimentos 3; ganho 2×10^5 ; modulação de amplitude 5 Gpp; potência de micro-ondas, 0,635 mW, atenuação 25 dB. Os parâmetros usados na simulação (A') do hemo P foram: $g_z = 2,96$, $g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$ (spin-baixo, $S = 1/2$) e do hemo E foram $g_z = 3,39$, $g_y = 2,02$, $g_x = 0,60$ (spin-baixo, $S = 1/2$). Como existe só contribuição do hemo P em (B), os parâmetros usados na simulação (B') foram: $g_z = 2,96$, $g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$ (spin-baixo, $S = 1/2$). Para a simulação (C') foram usados os seguintes parâmetros: hemo HP₂ (spin-baixo): $g_z = 2,94$, $g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$ e para HP₁ (spin-baixo, $S = 1/2$) e $g_z = 2,80$, $g_y = 2,25$, $g_x = 1,54$. Na figura estão identificados os valores de g e a sua atribuição em relação aos hemos.

Figura 3.8 Espectros de ¹H-RMN de uma solução de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (827 µM), adquiridos num espectrómetro de RMN Avance a 400 Hz. (A) PCc oxidada, (B) PCc oxidada após a adição de cloreto de cálcio 2 mM e (C) PCc na forma de valência mista na presença de iões cálcio e de ascorbato de sódio 2 mM após 60 minutos de incubação. Condições experimentais: Tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), temperatura de 303 K, 10% de D₂O.

Figura 3.9 O anel da protoporfirina IX de um hemo tipo c, onde se vêem quatro grupos metilo do anel e os quatro prótons meso (α, β, γ e δ). M₁-Grupo metilo rodeado a azul, M₂- Grupo metilo rodeado de vermelho, M₃- Grupo metilo rodeado de laranja e M₄- Grupo metilo rodeado de verde (Nomenclatura da IUPAC-IUB).

Figura 3.10 Espectros de visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* durante a sua redução, a pH 7,5, (A) na presença e (B) na ausência de excesso de iões cálcio. Em (A) (—) E = +361 mV, (---) E = +237 mV, (---) E = +38 mV, (---) E = -124 mV, (—) E = -327 mV. Em (B) (—) E = +210 mV, (---) E = +148 mV, (---) E = +52 mV, (---) E = -128 mV, (—) E = -295 mV. Condições experimentais: PCc 5,4 µM, tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) (no início da titulação) na presença de mediadores e de CaCl₂ 1 mM.

Figura 3.11 Curvas de titulação de oxidação-redução, seguida por espectroscopia de UV-visível ($\lambda = 545$ nm), da peroxidase do citocromo c de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, (A) após a adição de iões cálcio e (B) sem adição de iões cálcio, em tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) na presença de mediadores. Titulação potenciométrica no sentido da redução (●) e no sentido da oxidação (○).

Figura 3.12 Voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento ($10 \leq v \leq 300$ mVs⁻¹) da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 100 µM, num EGPF. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) e cloreto de cálcio 1 mM.

Figura 3.13 Variação das correntes do pico (A) anódico e (B) catódico com a velocidade de varrimento. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) e CaCl₂ 1 mM.

Figura 3.14 Variação do potencial formal, E^{0'}, da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com o pH, determinada por voltametria cíclica usando um EGPF ($E^{0'} = -54 \text{ pH} + 266$, $r = 0,9$).

Figura 3.15 Voltamogramas de impulso diferencial de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, (100 μM), obtidos com um EGPF em presença de Ascorbato de sódio (1mM), DAD (2 μM). (—) Primeiro, (---) segundo e (....) terceiro voltamograma consecutivos.. (—) Voltamograma de impulso diferencial obtido com um eléctrodo de grafite pirolítica onde secou, durante 30 minutos, uma solução com Ascorbato de sódio (1mM), DAD (2 μM) e cálcio 1 mM. Electrólito HEPES 10 mM (pH 7,5) em presença de cloreto de cálcio 1 mM

Figura 3.16 Voltamogramas de impulso diferencial consecutivos de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, (100 μM), obtidos com um EGPF, a diferentes valores de pH. Primeiro (—), segundo (---) e terceiro (....) voltamograma consecutivos. Condições experimentais: tampão MES 10 mM (pH 5,5 e pH 6,0), tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 6,5), tampão HEPES 10 mM (pH 7,0 e pH 7,5) em presença de cloreto de cálcio 1 mM.

Figura 3.17 Voltamogramas de impulso diferencial de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 100 μM na ausência de peróxido (primeiro (—), segundo (---), terceiro (---), quarto (.....) e o que antecedeu a adição de peróxido de hidrogénio(-----)) e (---) os quatro primeiros voltamogramas consecutivos (1, 2, 3 e 4) após a adição de peróxido de hidrogénio 750 μM , obtidos usando um EGPF. Inserção: ampliação dos primeiros quatro voltamogramas consecutivos (primeiro (—), segundo (---), terceiro (---), quarto (.....) na ausência de peróxido de hidrogénio e do que antecedeu a adição de peróxido de hidrogénio (-----). Condições experimentais: electrólito de referência bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) com CaCl_2 1 mM.

Figura 3.18 Voltamogramas cíclicos ($E_i = + 0,400 \text{ V}$, $E_{\text{inv}} = - 0,450 \text{ V}$, $E_f = + 0,400 \text{ V}$) a $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 100 μM na (I) ausência e (II) na presença de peróxido de hidrogénio 750 μM , obtidos usando um EGPF. Condições experimentais: electrólito de referência bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) com CaCl_2 1 mM.

Figura 3.19 Variação do potencial catalítico da catálise da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com o pH, determinada por voltametria cíclica usando EGPF ($E_{\text{cat}} = -0,033 \text{ pH} + 0,152$, $r = 0,9$).

Figura 3.20 Voltamogramas de impulso diferencial consecutivos de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (100 μM), obtidos com um EMGP em HEPES 10 mM (pH 7,5). Primeiro (—), segundo (---) e terceiro (....) Condições experimentais: HEPES 10 mM (pH 7,5) em presença de CaCl_2 1 mM.

Figura 3.21 Modelo do mecanismo de redução/oxidação da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*.

Figura 4.1 (A) Voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento ($10 \leq v \leq 200 \text{ mVs}^{-1}$) do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a 35 μM , num EMGP. (B) Variação das correntes catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varrimento. (C) Variação das correntes anódicas com a raiz quadrada da velocidade de varrimento. Electrólito: bis-tris-propano 10 mM (pH 7,6) em presença de CaCl_2 1 mM. Equações das rectas: $i_p^c = - 1,69 v^{1/2}$, $r = 0,99$, $i_p^a = 1,49 v^{1/2}$, $r = 0,99$.

Figura 4.2 Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) de diferentes concentrações de citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* num EMGP. Condições experimentais: bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) em presença de CaCl_2 1 mM.

Figura 4.3 Variação do potencial formal, E^0 , do citocromo c_{552} com o pH, a força iónica constante. Condições experimentais: determinação por voltametria cíclica (20 mVs^{-1}) usando um EMGP com citocromo c_{552} 35 μM . O ajuste efectuou-se utilizando a equação 4.2 e um algoritmo do programa *Excel* (Solver), obtendo-se um valor de pK_a de $10,7 \pm 0,1$.

Figura 4.4 (A) Variação do potencial formal e (B) das correntes do pico anódico e catódico com a força iónica, dos voltamogramas cíclicos do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 35 μM , num EMGP. Electrólito: bis-tris-propano 10 mM a pH 6,5 (\square) e a pH 7,5 (\bullet) na presença de CaCl_2 1 mM.

Figura 4.5 (A) Variação do potencial formal com o pH e (B) e com a força iónica a a pH 6,5 (\square) e a pH 7,5 (\bullet) dos voltamogramas cíclicos do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 35 μM , num EMGP. Electrólito: bis-tris-propano 10 mM em presença de CaCl_2 1 mM. O perfil da variação do potencial com o pH foi simulado usando a equação 4.3 e um pK_a de $10,8 \pm 0,1$.

Figura 4.6 Esquema da catálise peroxidase do citocromo c mediada pelo citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*: O eléctrodo reduz o citocromo c_{552} que é rapidamente reoxidado pela enzima a qual é regenerada pela conversão do peróxido de hidrogénio a água. Adaptado da referência 169.

Figura 4.7 Variação das correntes catalíticas ao longo do tempo após adição de 0,5 mM (\circ) ou 1,0 mM (\bullet) de peróxido de hidrogénio utilizando EMGP. Correntes catalíticas obtidas nas seguintes condições: voltamogramas cíclicos a 20 mV s^{-1} de citocromo c_{552} 35 μM , peroxidase do citocromo c 4,6 μM , em bis-tris-propano 10 mM (pH = 7,5) e CaCl_2 1 mM.

Figura 4.8 Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) da catálise da peroxidase do citocromo c 4,6 μM mediada pelo citocromo c_{552} 35 μM de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, usando um EMGP, em bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM, na ausência (----) e na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (—).

Figura 4.9 Variação da corrente catalítica com a concentração de peróxido de hidrogénio, a partir dos voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) obtidos com EMGP. Os pontos foram ajustados a uma cinética de Michaelis-Menten. A solução de trabalho continha citocromo c_{552} 35 μM , PCc 4,6 μM e CaCl_2 1 mM, em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5). Inserção: linearização de Eadie-Hofstee dos valores da corrente catalítica em função da razão entre a corrente catalítica e a concentração de peróxido de hidrogénio. Cinética de Michaelis – Menten, ajustada com $K_M = (65 \pm 2) \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = i_{\text{cat Max}} = (302 \pm 2) \text{ nA}$ (valores obtidos pela linearização de Eadie-Hofstee (Capítulo 2 | Materiais e métodos (2.10.5)).

Figura 4.10 (A) Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) em tampão bis-tris-propano, 10 mM (pH 7,5), obtidos com EMGP. Condições experimentais: citocromo c_{552} 35 μM , CaCl_2 1 mM, peróxido de hidrogénio 1 mM e peroxidase do citocromo c em diferentes concentrações. (B) i_{cat}/i_p em função de $(1/v)^{1/2}$ e (C) variação da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (k') com a concentração de PCc. Equação da recta: $k' = 0,43 [\text{PCc}] + 1,77$ com $r = 0,99$. A constante de pseudo-primeira ordem, (k') foi obtida a partir do declive das rectas de (i_{cat}/i_p) em função de $(1/v)^{1/2}$ (equação 4.5).

Figura 4.11 Variação da corrente catalítica, i_{cat} , com o pH. Ensaaios com EMGP, com uma solução de trabalho de citocromo c_{552} 35 μM e peroxidase do citocromo c 4,6 μM , em presença de CaCl_2 1 mM, peróxido de hidrogénio 1 mM. Soluções tampão utilizadas 10 mM: acetato (pH 5,0), MES ($5,5 < \text{pH} < 6,5$), HEPES ($7,0 < \text{pH} < 7,5$), bis- tris-propano ($8,0 < \text{pH} < 8,5$) e CAPS (pH 8,9). O ajuste da curva efectuou-se utilizando a equação (2.18) e um algoritmo do programa Excel (Solver) permitiu estimar os $\text{pK}_{a1} = 5,8 \pm 0,1$ e $\text{pK}_{a2} = 7,5 \pm 0,1$.

Figura 4.12 Variação das correntes catalíticas com a força iónica. (\circ) Condição 1 (a solução de trabalho e o electrólito têm a mesma força iónica) e (\bullet) Condição 2 (a solução de trabalho e o electrólito tem diferente força iónica). Condições experimentais: voltametria cíclica

($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) em solução de bis-tris-propano, 10 mM (pH 6,5) com peroxidase do citocromo *c* 4,6 μM , citocromo c_{552} 35 μM , CaCl_2 1 mM e peróxido de hidrogénio 1 mM.

Figura 4.13 Variação da corrente catalítica, i_{cat} , com a força iónica a pH 6,5 (●) e a pH 7,5 (○) e dependência das correntes de pico, i_p^c para a redução do citocromo c_{552} a pH 6,5 (◆) e a pH 7,5 (◇), determinadas por voltametria cíclica ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) com EMGP. Condições experimentais para a catálise mediada: citocromo c_{552} 35 μM e peroxidase do citocromo *c* 4,6 μM , CaCl_2 1 mM em tampão bis-tris-propano 10 mM e peróxido de hidrogénio 1 mM. A variação da força iónica efectuou-se pela adição de pequenos volumes de solução de NaCl 6 M ao electrólito. Condições experimentais para a redução do citocromo c_{552} 35 μM : bis-tris-propano 10 mM, na presença de CaCl_2 1 mM.

Figura 4.14 A variação da actividade por centro catalítico da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com a concentração de PCc. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), citocromo c_{552} 7 μM , CaCl_2 1 mM e peróxido de hidrogénio 100 μM . Equação da recta: $k' = 8,03 [\text{PCc}] + 0,07$, $r = 0,989$. A PCc foi activada como descrito no Capítulo 2| 2.7.1.

Figura 4.15 Variação da actividade da PCc com o pH. Condições experimentais: citocromo c_{552} 7 μM , peroxidase do citocromo *c* 24 nM, CaCl_2 1 mM e peróxido de hidrogénio 100 μM . Soluções tampão utilizadas 10 mM: acetato (pH 5,0), MES ($5,5 < \text{pH} < 6,5$), HEPES ($7,0 < \text{pH} < 7,5$), bis-tris-propano ($8,0 < \text{pH} < 8,5$) e CAPS (pH 8,9). O ajuste da curva foi feito utilizando a equação (4.13) com $\text{p}K_{a1} = 5,5 \pm 0,1$ e $\text{p}K_{a2} = 8,5 \pm 0,1$, ocorrendo a actividade máxima para pH 7,0.

Figura 4.16 Actividade por centro catalítico da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em função da concentração de NaCl a pH 7,5, usando (●) o citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* ou (○) o citocromo *c* de cavalo como doador de electrões. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), citocromo c_{552} 7 μM , citocromo *c* de cavalo 7 μM , peroxidase do citocromo *c* 24 nM, CaCl_2 1 mM e peróxido de hidrogénio 100 μM .

Figura 5.1 Espectro ^1H -RMN da forma oxidada de 234 μM de citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (Tris-HCl 1 mM (pH 7,5), CaCl_2 2 mM, 303 K). O espectro foi adquirido num espectrómetro de RMN AVANCE III (600 Hz) equipado com uma crio-sonda TCI. As ressonâncias identificadas como M1, M2, M3 e M4, são respectivamente a 34,95 ppm, 27,85 ppm, 14,67 ppm e a 13,83 ppm. A ressonância identificada como $\text{C}_6\text{-CH}_3$ está localizada a -15,1 ppm e é atribuída ao grupo $\varepsilon\text{-CH}_3$ da metionina axial [165].

Figura 5.2 Titulação do citocromo c_{552} com peroxidase do citocromo *c*. Condições experimentais: espectros foram adquiridos num espectrómetro de RMN AVANCE III (600 Hz) equipado com uma crio-sonda TCI. A titulação efectuou-se em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), CaCl_2 2 mM, a 303 K.

Figura 5.3 Variação do desvio químico dos grupos metilo M4 (1-CH_3) do citocromo c_{552} , em função da razão entre peroxidase do citocromo *c* e o citocromo c_{552} . A curva foi simulada tendo em conta a formação de um complexo 1:2 sendo estimada uma constante de dissociação de $K_D = 47 \mu\text{M}$.

Figura 5.4 (A) Estrutura (imagem da esquerda) e superfície de potencial electrostático (imagem da direita) da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma oxidada (código do PDB 1IRZ6). (B) Estrutura (imagem da esquerda) e distribuição de resíduos carregados na superfície (imagem da direita) da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma de valência mista (código do PDB 1IRZ5). As cadeias de aminoácidos estão coloridas de acordo com a estrutura secundária, os hemo estão coloridos a

preto e o ião cálcio a verde. Na representação da superfície a coloração azul representa as partes básicas carregadas positivamente na superfície da proteína e a vermelha representa os resíduos acídicos negativamente carregados da superfície da proteína. As imagens da PCc (I) estão rodadas 90° (II) sobre o eixo dos xx. A vizinhança do hemo E da PCc exposto ao solvente (provável local de interação com o citocromo *c*) está circundada a preto na representação da superfície da enzima ou assinalado com uma seta na estrutura da proteína.

Figura 5.5 Estrutura e superfície de potencial electrostático de (A) do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e (B) do citocromo *c* de cavalo. Na fórmula estrutural a cor cinzenta apresenta-se a estrutura secundária dos citocromos e os hemos estão coloridos a preto. Na representação de potencial electrostático os resíduos carregados positivamente na superfície da proteína tem a coloração azul e os resíduos acídicos negativamente carregados da superfície da proteína a cor vermelha. As imagens de cima e de baixo encontram-se na mesma disposição, a representação I está rodada 90° (representação II) sobre o eixo dos YY. Circundada a preto está a vizinhança do metilo exposto ao solvente.

Figura 5.6 A Distância entre os hemos do citocromo *c*₅₅₂ e o hemo de transferência de electrões da peroxidase do citocromo *c* para as 50 melhores soluções da simulação de atracamento entre o dímero do citocromo *c*₅₅₂ e o dímero da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma oxidada com (A) 300 contactos e com (B) 500 contactos. As soluções dentro das caixas, são as que apresentam simultaneamente uma posição de classificação global e uma distância reduzida entre os ferros hémicos (citocromo *c*₅₅₂ - hemo E).

Figura 5.7 Complexo de transferência electrónica entre o dímero da PCc em valência mista (A, C e E) (ID-2827), ou oxidada (B, D e F) (ID- 3498 e ID- 1080) e dímero do citocromo *c*₅₅₂. Representação das quinhentas melhores soluções para o atracamento molecular, encontradas com 300 contactos, pelo critério de classificação global (A, B), de hidrofobicidade (C, D) e interações electrostáticas (E, F). As figuras foram preparadas usando o programa Chemera. As hipotéticas posições do centro molecular do dímero do citocromo *c*₅₅₂ estão representadas como esferas, à volta de estrutura da PCc. As esferas a vermelho são as que apresentam melhor indexação na característica referida, sendo as verdes as que apresentam pior indexação. As posições que poderão proporcionar a transferência de electrões estão circundadas a vermelho. Os iões cálcio estão coloridos a cor azul claro e os hemos da PCc a preto.

Figura 5.8 As estruturas das duas melhores soluções de atracamento molecular entre o dímero de PCc (A) na forma oxidada (ID 3498) e (B) na forma de valência mista (ID-2827) e o dímero do citocromo *c*₅₅₂. A distância entre o ferro hémico do hemo E (HE) da PCc em valência mista e o centro com ferro hémico do citocromo *c*₅₅₂ na estrutura ID-2827 é 19 Å, sendo a distância entre o hemo E da PCc na forma oxidada e o centro com ferro hémico do citocromo *c*₅₅₂ na estrutura ID-3498 de 19 Å. A estrutura da PCc apresenta-se com cor preta tal como os hemos, o citocromo apresenta-se com a cor vermelha tal como o hemo e o ião cálcio apresenta-se a azul. As figuras foram preparadas utilizando o programa Chemera.

Figura 5.9 Complexo de transferência electrónica entre o dímero da PCc na forma oxidada e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global (A), a hidrofobicidade (C) e as interações electrostáticas (E) respectivamente e o dímero da PCc na forma de valência mista e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global, a hidrofobicidade e as interações electrostáticas (B), (D) e (F), respectivamente. Representação das quinhentas melhores soluções para o atracamento molecular encontradas com 300 contactos. Figuras preparadas usando o programa Chemera. As hipotéticas posições do centro molecular do citocromo *c* de cavalo estão representadas como esferas. As esferas a vermelho são as que apresentam melhor indexação na característica referida, sendo as verdes as que apresentam pior indexação.

Figura 5.10 Representação melhor solução para o complexo de transferência electrónica entre (A) o dímero da PCc na forma inactiva e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global, a hidrofobicidade e as interacções electrostáticas (ID-1861) e (B) entre o dímero da PCc na forma activa e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global, a hidrofobicidade e as interacções electrostáticas (ID- 4318). Soluções de atracamento molecular obtidas com 300 contactos. Figuras preparadas usando o programa Chemera. O citocromo *c* de cavalo está representado a vermelho e a PCc a preto. Os iões cálcio estão coloridos a azul claro.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Potenciais formais de espécies reactivas de oxigénio produzidas *in vivo*.

Tabela 1.2 Percentagem de sequência de alinhamento idênticas¹ das estruturas primárias apresentadas na Figura 1.4

Tabela 1.3 Propriedades bioquímicas de peroxidase do citocromo *c* bacterianas periplásmicas.

Tabela 1.4 Propriedades espectroscópicas de peroxidase do citocromo *c* bacterianas.

Tabela 1.5 Condições de activação das peroxidases do citocromo *c* bacterianas.

Tabela 2.1 Composição do meio de cultura líquido, para o crescimento da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* 617. O pH do meio foi ajustado a 7,5 e o meio foi esterilizado numa autoclave [70].

Tabela 2.2 Soluções adicionadas ao meio de cultura líquido para o crescimento da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Estas soluções foram preparadas e autoclavadas separadamente [70].

Tabela 2.3 Composição da solução de oligoelementos de Starkey [216]. Esta solução foi esterilizada numa autoclave.

Tabela 2.4 Quantidade de nitrato de sódio e velocidade de agitação utilizadas em cada um dos crescimentos realizados no microfermentador.

Tabela 2.5 Mediadores redox usados e o respectivo potencial de redução a pH 7,0.

Tabela 3.1 Massa de células húmidas obtida de 10 L de cultura de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e quantidade de PCc purificada, utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio.

Tabela 3.2 Tabela de purificação da peroxidase do citocromo *c* e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

Tabela 3.3 Variação da massa molecular aparente com a força iónica, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), [PCc] = 11,5µM, [cit *c*₅₅₂] = 10 µM.

Tabela 3.4 Valores de *g* das ressonâncias observadas nos espectros de RPE da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* nas formas oxidada e de valência mista.

Tabela 3.5 Valores de desvio químico observado nos espectros de ¹H-RMN de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

Tabela 3.6 Potenciais formais de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em tampão HEPES (pH 7,5) 10 mM.

Tabela 3.7 Potenciais (*E*_p), correntes (*i*_p) e largura de pico a meia altura (δ) dos picos catódico e anódico dos voltamogramas cíclicos de PCc a diferentes velocidades de varrimento.

Tabela 3.8 Diferença entre o potencial anódico e o potencial catódico, ΔE_p , razão i_p^a/i_p^c e a média dos potenciais, a diferentes velocidades de varrimento dos voltamogramas cíclicos.

Tabela 3.9 Potencial dos dois sinais observados nos voltamogramas de impulso diferencial de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em EGPF (primeiro varrimento).

Tabela 4.1 Correntes catódicas (i_p^c) e anódicas (i_p^a), potenciais catódicos (E_p^c) e anódicos (E_p^a) e razão entre as correntes catódicas e anódicas (i_p^c/i_p^a), dos voltamogramas cíclicos do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, 35 μ M, num EMGP.

Tabela 4.2 Razão entre as correntes catódicas e anódicas (i_p^c/i_p^a), diferença de potenciais entre os potenciais catódicos e anódicos (ΔE_p) e média ($(E_p^c + E_p^a)/2$) dos voltamogramas cíclicos do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, 35 μ M, num EMGP para as diferentes velocidades de varrimento.

Tabela 4.3 Variação das correntes catalíticas e de k' com a força iónica na catálise mediada a pH 6,5.

Tabela 4.4 Potenciais catalíticos, formal e correntes catalíticas obtidas no estudo do efeito da força iónica na catálise mediada entre a PCc e citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a pH 7,5.

Tabela 5.1 Variações no desvio químico de algumas ressonâncias do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, induzidas pela formação do complexo.

Tabela 5.2 Análise de atracamento molecular entre a PCc nas diferentes formas e os doadores de electrões, efectuado usando as 500 melhores das 5000 soluções do algoritmo BiGGER.

Tabela 5.3 Parâmetros das melhores soluções de modelos de complexos obtidos pelo atracamento do doador de electrões (citocromo c) na Peroxidase do citocromo c de *Ma. hydrocarbonoclasticus* usando o programa Chemera e o atracamento com o algoritmo BiGGER.

Tabela 5.4 Análise de atracamento molecular entre a PCc nas diferentes formas e o citocromo c de cavalo efectuado usando as 50 melhores das 5000 soluções do algoritmo BiGGER.

Tabela 5.5 Parâmetros das melhores soluções de modelos de complexos obtidos pelo atracamento da Peroxidase do citocromo c de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com o citocromo c de cavalo usando o programa Chemera e o atracamento molecular com o algoritmo BiGGER.

Tabela 6.1 Características espectroscópicas da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, pH 7,5.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.a.	Aminoácidos
Abs	Absorvância
ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANR	Regulador da arginina diaminase e nitrato reductase
AP	Alto potencial
Asc ou asc	Ascorbato de sódio
ATCC	“American Type Culture Collection”
Cit	Citocromo <i>c</i>
<i>ccp</i>	Gene que codifica para as PCc
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
DAD	Diaminodurol (2,3,5,6 –tetrametil-p-fenileno-diamina)
Dsb	Oxidoreductase dissulfureto
HE	Hemo de transferência electrónica
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
EGPF	Eléctrodo de grafite pirolítica com filme de proteína
EGPM	Eléctrodo de grafite pirolítica com membrana
FPLC	Cromatografia líquida de elevado fluxo
FNR	Regulador da redução do fumarato e nitrato (fumarato reductase)
GP	Grafite pirolítica
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de protão
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
H ou His	Histidina
HTP	Hidroxiapatite
HP	Hemo peroxidáctico
IUPAC-IUB	União Internacional de Química Pura e Aplicada- Comissão de Nomenclatura Bioquímica
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico
M ou Met	Metionina
<i>k</i>	Constante de velocidade para a reacção de transferência de carga
<i>K_M</i>	Constante de Michaelis-Menten
<i>K_a</i>	Constante de acidez

K_f	Constante de formação
K_D	Constante de dissociação
OxyR	Proteína reguladora
PDB	Protein Data Bank
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PCc	Peroxidase do cotocromo <i>c</i>
pI	Ponto isoeléctrico
RPE	Ressonância paramagnética electrónica
SA	Spin-alto
SB	Spin-baixo
Sec	Sistema de transporte de proteínas através da membrana (<u>Secretion</u>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TMBZ	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UV	Ultra violeta
VC	Voltametria cíclica
VDP	Voltametria de impulso diferencial

Microorganismos

<i>Ec.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Gs.</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
<i>He.</i>	<i>Herbaspirillum</i>
<i>Ma.</i>	<i>Marinobacter</i>
<i>Mh.</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
<i>Mc.</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
<i>Mm.</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Ne.</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Ni.</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
<i>Pad.</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
<i>Pp.</i>	<i>Paracoccus pantotrophus</i>
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas sutzeri</i>
<i>Pa.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Rc.</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>

<i>Sa</i>	<i>Salmomenlla</i>
<i>So.</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
<i>Sw</i>	<i>Shewanella</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área do eléctrodo
B	Campo magnético
P	Baixo potencial
C, c	Concentração da espécie electroactiva no seio da solução
C_e	Centro de transferência electrónica
D	Coeficiente de difusão
$D_{0(R)}$	Coeficiente de difusão da espécie oxidada (reduzida)
D	Dalton
E	Potencial
ENH	Potencial normal de hidrogénio
$E^{0'}$	Potencial formal
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
$E_p^{c(a)}$	Potencial do pico catódico (anódico)
g	Factor g
$g_{\text{máx}}$	g máximo
g_{med}	g médio
g_{min}	g mínimo
i	Corrente
i_d	Corrente de difusão
i_p	Corrente de pico
$i_p^{c(a)}$	Corrente do pico catódico (anódico)
l	Largura da célula
n	Número de electrões trocados
O	Espécie oxidada
R	Espécie reduzida
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo
T	Temperatura
v	Velocidade de varrimento

V	Volume da solução de trabalho
ΔE_p	Diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico
$\Delta E_{p,1/2}$	Largura total a meia altura do pico
α	Coeficiente de transferência de carga
δ	Desvio químico
ε	Absortividade molar

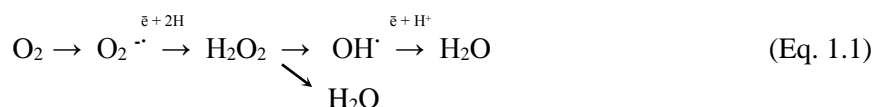
Constantes

F	Constante de Faraday (96485 C mol ⁻¹)
R	Constante dos gases ideais (8,314 JK ⁻¹ mol ⁻¹)

1.1 As espécies reactivas de oxigénio e o *stress oxidativo in vivo*

Ao longo da evolução, os organismos vivos tiveram que se adaptar ao aumento da quantidade de dioxigénio na atmosfera. Uma atmosfera primordial rica em vapor de água, dióxido de carbono e dinitrogénio deu origem a uma atmosfera rica em oxigénio molecular [1]. Actualmente são conhecidos quatro processos biológicos que geram dioxigénio, a fotossíntese, a desintoxicação de espécies reactivas de oxigénio (ERO), o metabolismo de redução de percloratos ou cloratos e a via metabólica que converte óxido nitroso em dinitrogénio e dióxido de carbono [2, 3]. Estes processos associados a processos químicos contribuíram para a alteração da composição da atmosfera terrestre [1- 3].

A presença de dioxigénio e a sua utilização no metabolismo celular, origina ERO, quando este não é completamente reduzido a água. A acumulação de ERO tem efeitos nocivos nos organismos, quer procarióticos quer eucarióticos [4- 6] (equação 1.1).



As fontes de ERO podem ser tanto de origem endógena como exógena [7- 9]. Isto é, podem ser produzidas pela exposição a condições externas, como o aumento da pressão de dioxigénio, incidência de radiações ionizantes (radiações γ), choque térmico, ou ainda pela presença de metais pesados ou de oxidantes químicos [10- 13]. Podem também ser produzidas pelos organismos como resposta imunitária, ou serem sub produtos do metabolismo celular, como o peróxido de hidrogénio [14, 15]. Algumas ERO podem ser sinalizadores de defesa celular, mas em quantidades elevadas podem também causar a morte celular uma vez que interagem com macromoléculas de ácidos nucleicos (ADN e ARN), proteínas e lípidos [16- 20].

A peroxidação lipídica consiste na captura por um radical hidroxilo, de um átomo de hidrogénio de uma cadeia de um ácido gordo, gerando um radical de ácido gordo. Este radical por sua vez pode reagir com o dioxigénio presente no meio celular formando um novo radical peróxido, que poderá reagir com outro ácido gordo, ou com outras macromoléculas, numa reacção em cadeia. Quando a peroxidação lipídica ocorre nas membranas celulares, as ERO poderão não só atacar os lípidos, como também as proteínas membranares, induzindo ligações cruzadas entre lípidos e entre estes e as proteínas, alterando a rigidez, a fluidez e a permeabilidade membranar bem como a actividade de enzimas ligadas à membrana [12, 14 e 20].

Os açúcares e as bases dos ácidos nucleicos são igualmente atacados pelas ERO originando rupturas nas cadeias de carbono, formando aductos entre as bases e os açúcares ou

ligações cruzadas com outras moléculas, o que impede a replicação e a transcrição [14, 19 e 20]. O radical hidroxilo, em particular, reage com o ADN, retirando um átomo de hidrogénio do grupo metilo da timina formando um radical alilo, ou quebrando as ligações C-H do açúcar formando radicais aductos com duas novas ligações (C-OH). Tanto os radicais alil, como os aductos sofrem reacções em cadeia que levam à degradação da cadeia de ADN [15, 16 e 20].

Algumas das reacções a que estão sujeitas as proteínas quando interagem com ERO são a oxidação de grupos sufidriilo, a redução de dissulfeto, reacções com aldeídos (produzidos por exemplo durante a peroxidação lipídica) e a fragmentação de peptídeos, o que leva à destruição das proteínas [15, 19 e 20].

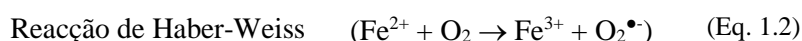
Entre as espécies reactivas de oxigénio produzidas intracelularmente, destaca-se, o oxigénio molecular singlete (O_2^*), o ião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo (HO^\bullet), os radicais peróxido (ROO^\bullet), os radicais alcoóxido (RO^\bullet), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) bem como outros peróxidos orgânicos ($ROOH$) [21- 23]. As espécies reactivas de oxigénio têm um poder oxidante superior ao do oxigénio molecular (Tabela 1.1), sendo por isso mais reactivas que este.

Tabela 1.1 Potenciais formais de espécies reactivas de oxigénio produzidas *in vivo*.

	Par redox	E^0 (V)
Espécies Reactivas de Oxigénio	$HO^\bullet, H^+ / H_2O$	+ 2,18
	$H_2O_2, 2H^+ / 2H_2O$	+ 1,76
	$RO^\bullet, H^+ / ROH$	+ 1,60
	$ONOO^- / \bullet NO_2$	+ 1,40
	$ROO^\bullet, H^+ / ROOH$	+ 1,00
	$H_2O_2, H^+ / H_2O, HO^\bullet$	+ 0,71
	$O_2, H^+ / H_2O_2$	+ 0,70
	$O_2 / O_2^{\bullet-}$	- 0,33

O radical hidroxilo, a ERO com maior poder oxidante (Tabela 1.1), tem um tempo de vida curto (tempo de meia-vida de 10^{-9} s) e uma difusão celular limitada, pelo que os seus efeitos nocivos são reduzidos [7, 24 e 25]. De entre as ERO mais abundantes *in vivo* destaca-se ainda o ião superóxido, com um tempo de meia-vida de 10^{-6} s, e o peróxido de hidrogénio, com um tempo de meia-vida de 10^{-5} s.

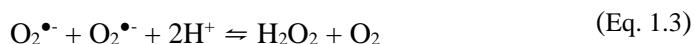
O ião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) surge intracelularmente através de reacções como a de Haber-Weiss (equação 1.2), onde ocorre a transferência de um electrão do catião $Fe(II)$ para o molécula de dioxigénio [7- 11, 26 e 27].



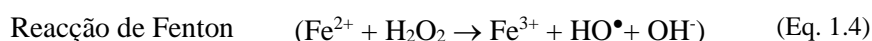
Todos os organismos apresentam, no entanto, mecanismos de defesa das ERO, de forma a proteger os seus componentes celulares de efeitos nocivos provocados por estas espécies, mantendo os seus níveis intracelulares em concentrações baixas [7, 10- 12, 22 e 29]. Estes mecanismos incluem a formação de substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico ou a

glutathiona [12, 20] e a síntese de enzimas que catalisam a eliminação de espécies reactivas de oxigénio, como as dismutases do superóxido, as catalases e as peroxidases [7, 16 e 17].

A eliminação do ião superóxido pelas dismutases do superóxido é um dos mecanismos de defesa dos organismos contra as ERO (equação 1.3)



O peróxido de hidrogénio é uma espécie reactiva de oxigénio não radicalar com origem exógena e endógena, que se forma intracelularmente em condições de hipoxia, durante a reacção de dismutação do ião superóxido (equação 1.3), pela auto-oxidação do quinol, que produz radicais superóxido que dismutam em peróxido de hidrogénio, ou ainda pela redução do oxigénio por oxidases terminais no caso de bactérias [30-32]. Este composto, mesmo em quantidades baixas, pode provocar o aumento da oxidação de tióis de proteínas, a carbonilação de proteínas e a peroxidação lipídica [6, 23- 25], uma vez que é um forte oxidante que, por interacção com metais como Fe (II) e Cu (II), forma outras espécies reactivas de oxigénio (HO^\bullet) [25- 27] (equação 1.4).



A protecção dos organismos vivos contra a acumulação de peróxido de hidrogénio implica a sua remoção, tendo os organismos sistemas enzimáticos que eliminam este composto.

As bactérias, por exemplo, apresentam dois tipos de enzimas capazes de catalisar a redução do peróxido de hidrogénio: as catalases e as peroxidases [28- 31]. As primeiras interagem com substâncias capazes de dispor de dois electrões simultaneamente (equação 1.5), já as peroxidases interagem com doadores de um só electrão (equação 1.6).



(S_{red} – substrato no estado reduzido, S_{ox} – substrato no estado oxidado)

As catalases catalisam a disproporção de H_2O_2 a água (equação 1.5). No caso das peroxidases bacterianas, estas reduzem o peróxido de hidrogénio a água, oxidando diversos substratos, que podem ser moléculas orgânicas como o ascorbato ou a lenhina [28, 29], ou proteínas como é o caso dos citocromos e das azurinas (que funcionam como doadores fisiológicos de electrões) [33, 34 e 51], sendo classificadas de acordo com o substrato que usam [35- 39] (equação 1.6).

As células eucarióticas também apresentam estes dois sistemas de defesa. As catalases citoplasmáticas e as peroxidases eucarióticas que estão localizadas no espaço intermembranar das mitocôndrias e contém um único hemo tipo *b*. A reacção global de redução do peróxido de hidrogénio a água, pelas peroxidases eucarióticas é idêntica à das peroxidases bacterianas, mas o mecanismo catalítico é muito diferente [35].

1.2 As peroxidases do citocromo *c* bacterianas dihémicas

As peroxidases do citocromo *c* (PCc) dihémicas foram isoladas de diversos organismos, tais como *Pseudomonas* (*Ps.*) *aeruginosa* [40- 44], *Paracoccus* (*Pa.*) *pantotrophus* [45- 53], *Ps. stutzeri* [54- 58], *Nitrosomonas* (*Ni.*) *europaea* [59- 62], *Rhodobacter* (*Rb.*) *capsulatus* [63- 67], *Methylococcus* (*Me.*) *capsulatus* [68, 69], *Marinobacter* (*Ma.*) *hydrocarbonoclasticus* [70, 71], *Neisseria* (*Ne.*) *gonorrhoeae* [72, 73], *Methylobacterium* (*Mm.*) *album*. BG8 [74], *Geobacter* (*Ge.*) *sulfurreducens* [75- 76] e *Shewanella* (*Sw.*) *oneidensis* [77- 80]. As enzimas mais estudadas são as que foram isoladas das bactérias *Ps. aeruginosa* e *Pa. pantotrophus*.

Estas enzimas são na sua maioria periplásmicas, sendo que em alguns casos podem estar ligadas à membrana celular, como acontece no caso da lipocitocromo *c* peroxidase de *Ne. gonorrhoeae* [72] e de *Herbaspirillum* (*He.*) *seropediceae* [81], ou podem estar associadas à parede celular exposta ao periplasma, como no caso das bactérias metanotróficas *Me. capsulatus* [68] e *Mm. album* BG8 [69]. Em *Mm. album* BG8 a PCc apresenta como característica particular, a sua dependência da biodisponibilidade de ião cobre (II).

Em alguns estudos verificou-se um aumento da sua expressão quando as bactérias estão expostas a peroxinitrito, o que levou à hipótese das PCc estarem também envolvidas na eliminação deste composto [76]. Foi também proposto por alguns autores que a PCc interfira na oxidação de metilaminas [69].

1.2.1 Regulação da expressão génica das peroxidases do citocromo *c* bacterianas

Em condições aeróbias, as bactérias anaeróbias facultativas, como bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*, utilizam o oxigénio molecular como aceitador final de electrões devido ao seu elevado potencial redox [7]. A alteração do metabolismo aeróbio para anaeróbio ocorre quando a quantidade de oxigénio no meio diminui e há um aceitador de electrões alternativo, como o ião nitrato, sendo este processo acompanhado por repressão dos genes ligados à respiração aeróbia, enquanto os genes ligados à respiração anaeróbia são induzidos [82- 84].

Os genes *fnr* e *anr* codificam para os reguladores da transcrição FNR (regulador da redução do fumarato e nitrato) e ANR (regulador transcricional anaeróbio), respectivamente. Estas proteínas reguladoras estão envolvidas na mudança de metabolismo aeróbio para o anaeróbio, controlam a expressão do gene *ccp* (que codifica para a peroxidase do citocromo *c*) e dos genes *nar* e *nir* respectivamente. Estes últimos codificam para proteínas que estão envolvidas na via de desnitrificação, como a NaR (reductase do nitrato) e a NiR (reductase do nitrito) em condições de baixa tensão de dioxigénio (condições de microaerofilia) [54, 68, 84- 98].

O gene da PCc é expresso em condições aeróbias e de microaerofilia e está presente tanto em bactérias aeróbias como estritamente anaeróbias como a *Ge. sulfurreducens* [75, 82, 95 e 97]. Este gene está sob a acção de dois reguladores transcricionais o FNR e o OxyR [99]. O primeiro é um regulador da activação induzido pelo oxigénio e o segundo pelo peróxido de hidrogénio [82, 85- 88].

i) O regulador da activação transcripcional FNR

O FNR é um regulador transcripcional, produto do gene *fnr*, que regula um grande número de genes em resposta a mudanças dos níveis de oxigénio molecular. Este regulador na forma activa e dimérica tem um domínio N-terminal com resíduos cisteína que coordena um cluster do tipo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, sensível ao oxigénio que se liga entre dois monómeros. Na presença de elevadas concentrações de oxigénio, o centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (forma activa) sofre alterações estruturais e transforma-se num centro $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ (forma inactiva) [84- 92].

A sequência palindrômica de ADN reconhecida pelo FNR encontra-se na zona a montante do local de início da transcrição do gene *ccp*, sendo a sequência de ADN do tipo TTGAT-N4-ATCAA [82, 95, 96 e 98].

Em *Ma. hydrocarbonoclasticus* a sequência palindrômica encontra-se, tal como anteriormente referido, na zona a montante do local de início da transcrição do gene *ccp* da PCc, PCC-MauG (Figura 1.1) [100].

```

tttcttctgagcataacttttataacctaataaaagcgggagagcacggcgttttctgcgc
gacgaaatgccgcagaaagatccacaaattgcagaccggaaccaaactttgatgaacatca
agttcagaaccaactctcgcgtttttgcatgaaccacgctgccactctgttacgttggg
accagatggataccgagttgtttctcaaaggagaaagcgacATGATCAAGCATCCACTGGC
AAAAGCACTACCCCTGAGCCTGGGCGTGGCAGCAGGTTCCGCCATGGCGGACAACCTGAT
GGAACGGGCCAACAGCATGTTTCGAGCCCATTTCCAAAATACCCACCGGTGATTGATGGCAA
TGAAGTCAACCCAGGCCAAGGTTGAACTGGGCAAGATGTTGTTCTTTGAACCGCGCTGTC
TTCCAGCCACCTGATCAGCTGCAACACCTGCCACAACGTCGGGCTGGGCGGTGATGACGA
GCTGCCTACCTCTATCGGCCATGGCTGGCAGAGGGTCCCCGGAATCGCCGACGGTGTT
CAACGCCGTGTTTAAACGCAGCCAGTTCTGGGATGGCCGTGCCGCCGACCTGGCCGAACA
GGCCAAAGGGCCGGTACAGGCGGTGTCGAGATGAGCAGTACGCCGACCGGTGGTGGC
TACCCTGAAGAGTATGCCGGAGTATATCGAGCGCTTTGAGGACGCATTCCCGGGCCAGGA
AAATCCGGTCACCTTCGACAATATGGCTGTTGCCATTGAAGCCTATGAAGCAACACTGAT
CACCCCGGAAGCACCTTTTCGACAAATATCTGCGCGGAGACACCTCAGCGCTGAACGAGAG
TGAGAAAGAAGGTCTGGCGCTGTTTCATGGACCGCGGCTGTACCGCTGCCACAGTGGTGT
GAACCTCGGCGGTGAGAGCTACCATCCATTCCGGGCTGGTTGCCAAGCCGGGTGCCGAGAT
CCTGCCAGAGGGCGATAAAGGCCGCTTCTCTGTACCCGAAACCGCGTCTGACGAGTATGT
GTTCCGCGCCTCTCCGCTGCGTAACATCGAGCTGACCGCGCCTATTTCCACTCTGGCGC
CGTCTGGAGCCTGGAAGAAGCCGTTGCGGTGATGGGTACGGCCAGCTGGGTACCGAGTT
GAACGACGATGAAGTGAATCCATCGTTCGCTTCCTCAAGACGCTTACCGGCAATGTTCC
GGAAGTAACTTATCCGGTACTGCCACCAAGCACCGCCAATACGCCCAAGCCGGTGGACAT
GATCCCGTAAgtcacgggctctgcattcacctcgaaggcgcgctttccggcgcgccct

```

Figura 1.1 Sequência de ADN (NCBI Referência da sequencia: NC-017067.1) do gene *ccp*-MauG (VIMSS3521861: Maqu-0372 citocromo *c* peroxidase 349 a.a.) da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (140 bases a montante, 1050 pares de base (gene *ccp* a negrito), 50 bases a jusante do gene *ccp*-MauG), onde se destaca a sequência de bases nucleicas reconhecida pelo regulador da transcrição FNR (dados retirados de www.microbesonline.org, acedido a 1 de Fevereiro 2013).

Em *Pa. pantotrophus* [83, 84 e 96], *Ps. aeruginosa* [93, 94], *Ne. gonorrhoeae* [91, 92] e *Ps. stutzeri* [54] verificou-se que o FNR regula não só a expressão do gene *ccp* [29, 95 e 97] em resposta à privação de dioxigénio [54, 95] mas também de vários genes envolvidos na desnitrificação. Em estudos com mutantes no gene *fnrP* em *Pa. denitrificans*, verificou-se que a expressão da peroxidase do citocromo *c* (PCc) é muito reduzida pelo que se propôs que, o FNRP controle a expressão desta proteína [96].

ii) O regulador da activação transcripcional OxyR

Em *Ps. aeruginosa*, *Salmonella (Sa) typhimurium* e *Escherichia (Ec.) coli*, o OxyR também é um regulador da transcrição do gene *ccp*, que codifica para a PCc e para a catalase, na presença de peróxido de hidrogénio [101- 106]. Em *Ps. aeruginosa* o gene *oxyR* que codifica para o regulador OxyR, localiza-se no operão com o gene *recG* [107]. Este gene em resposta a alterações dos níveis de peróxido de oxigénio, induz a transcrição de OxyR.

Cada molécula de OxyR apresenta dois domínios que contêm duas cisteínas, que se localizam na interface dos dois dímeros que formam um tetrâmero [108- 110]. A sequência palindrômica reconhecida pelo OxyR, e à qual se liga no ADN, consiste em quatro grupos de 4 bases (ATAG) espaçados por 10 pares de bases em *Ps. aeruginosa* [111, 112]. As formas oxidada e reduzida deste factor transcripcional contactam em diferentes locais no ADN, uma vez que nos dois locais activos de redução e oxidação as cisteínas estão em posições diferentes, resultando em alteração estrutural no domínio regulador [102, 109].

1.2.2 Regulação genética de peroxidases do citocromo *c* nas bactérias gram-negativas

As proteínas periplásmicas bacterianas, como a PCc, são sintetizadas no citoplasma e depois transportadas para o periplasma, através da membrana citoplasmática [113, 114]. Em bactérias gram-negativas com a *Pa. denitrificans* [115, 116] e *Rb. capsulatus* [117] a translocação do apo-citocromo linear faz-se através do sistema secretor SecYEG (sistema de secreção constituído por proteínas translocadoras), já o hemo é transportado pelo sistema CcmABCDGEF (sistema de maturação de citocromos c) [118, 119].

Para a translocação através da membrana citoplasmática, a pré-apo-proteína utiliza o sistema de sinalização constituído por um peptídeo-sinal adjacente ao N-terminal da cadeia polipeptídica, que permite ao sistema de transporte membranar (SecYEG) reconhecer e translocar para o periplasma a pré-apo-proteína. Após o transporte da pré-apo-proteína para o periplasma, o péptideo-sinal é removido por clivagem por acção de uma peptidase-sinal, formando a apo-proteína (Figura 1.2) [115- 119].

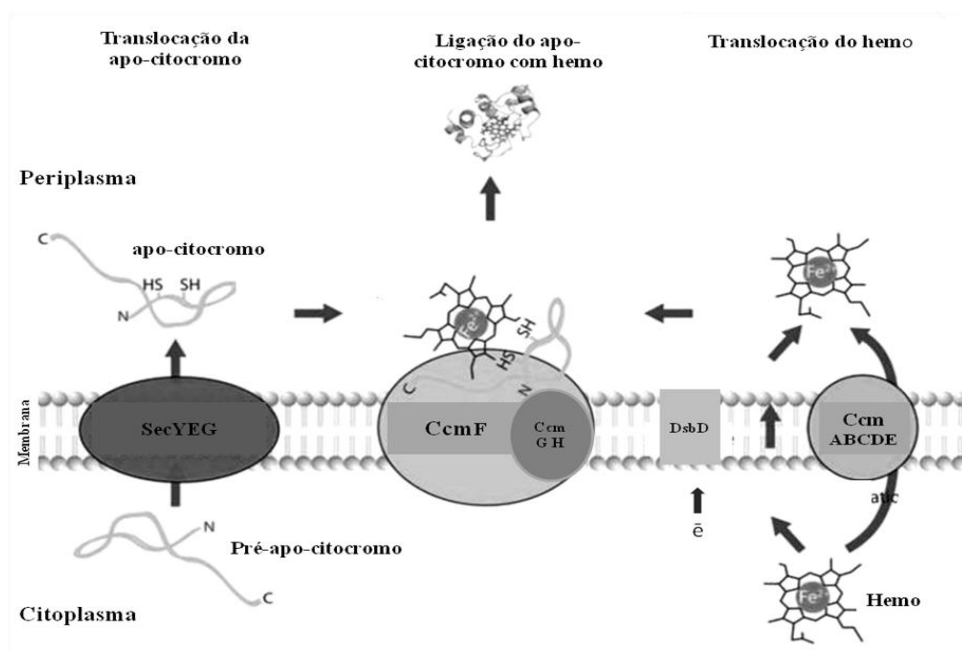


Figura 1.2 Esquema da organização do sistema de maturação de citocromos tipo *c* (Ccm) na membrana citoplasmática e da translocação do hemo em bactérias Gram-negativas [112, 113]. O pré-apo-citocromo é transferido do citoplasma para o periplasma translocador SecYEG (sistema de transporte secretor) e o grupo hemo pelo sistema de transporte complexo CcmABC, CcmD e CcmE. A incorporação do hemo no apo-citocromo ocorre em CcmF, usando electrões transferidos pela proteína transmembranar DsbD (oxidoreductase dissulfureto). Os sistemas CcmG e CcmH libertam o citocromo para o periplasma [112, 113 e 119]. O sistema de maturação de citocromo tipo *c*, Ccm, é constituído por proteínas membranares ou que estão ligadas á membrana (CcmABCDEFGH e DsbD). As setas são caminhos do sistema de maturação (Figura adaptada da referência 113, 114 e 119).

Na PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, o peptídeo-sinal é composto pelos primeiros resíduos que apresentam características de peptídeo-sinal (peptídeo hidrofóbico localizado no extremo N da cadeia polipeptídica) e são reconhecidos pelo sistema secretor SecYEG. Este peptídeo sinal inicia-se no primeiro aminoácido (metionina) terminando no aminoácido 23, sendo o domínio da apo-proteína PCc do aminoácido 24 ao 289 (previsão obtida em <http://www.signalP.4.1>) (Figura 1.3) [120].

```

MIKHPLAKALTSLGVAAGSAMA DNLMERANSMFEPKYPVPVIDGNELTQAKVELGKML
FFEPRLSSSHLISCNTCHNVGLGGDELPTSIGHGWQKGPRNSPTVFNAVFNAAQFWDGR
AADLAEQAKGPVQAGVEMSSTPDRVVATLKSMPYIERFEDAFPGQENPVTFDNMAVAIE
AYEATLITPEAPFDKYLRGDT SALNESEKEGLALFMDRGCTACHSGVNLGGQSYHPFGLV
AKPGAIEILPEGDKGRFSVTETASDEYVFRASPLRNIELTAPYFHSGAVWSLEEAVVMGT
AQLGTELNDDEVKSIVAFKLTLTGNVPEVTYPVLPSTANTPKFVDMIP

```

Figura 1.3 Sequência de aminoácidos da PCc de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840, onde se destaca o peptídeo-sinal (caixa cinzenta). Previsão obtida em <http://www.signalP.4.1> [120].

1.2.3 Alinhamento da sequência primária de peroxidases do citocromo *c* dihémicas

O alinhamento da sequência primária das PCc cuja estrutura terciária é conhecida, evidência uma grande homologia estrutural entre estas enzimas. Na Figura 1.4 apresenta-se o alinhamento da sequência primária de algumas PCc bacterianas, onde se destacam a cinzento os aminoácidos conservados e a vermelho os semi-conservados, bem como os hemos e os *Loop*, que serão seguidamente descritos.

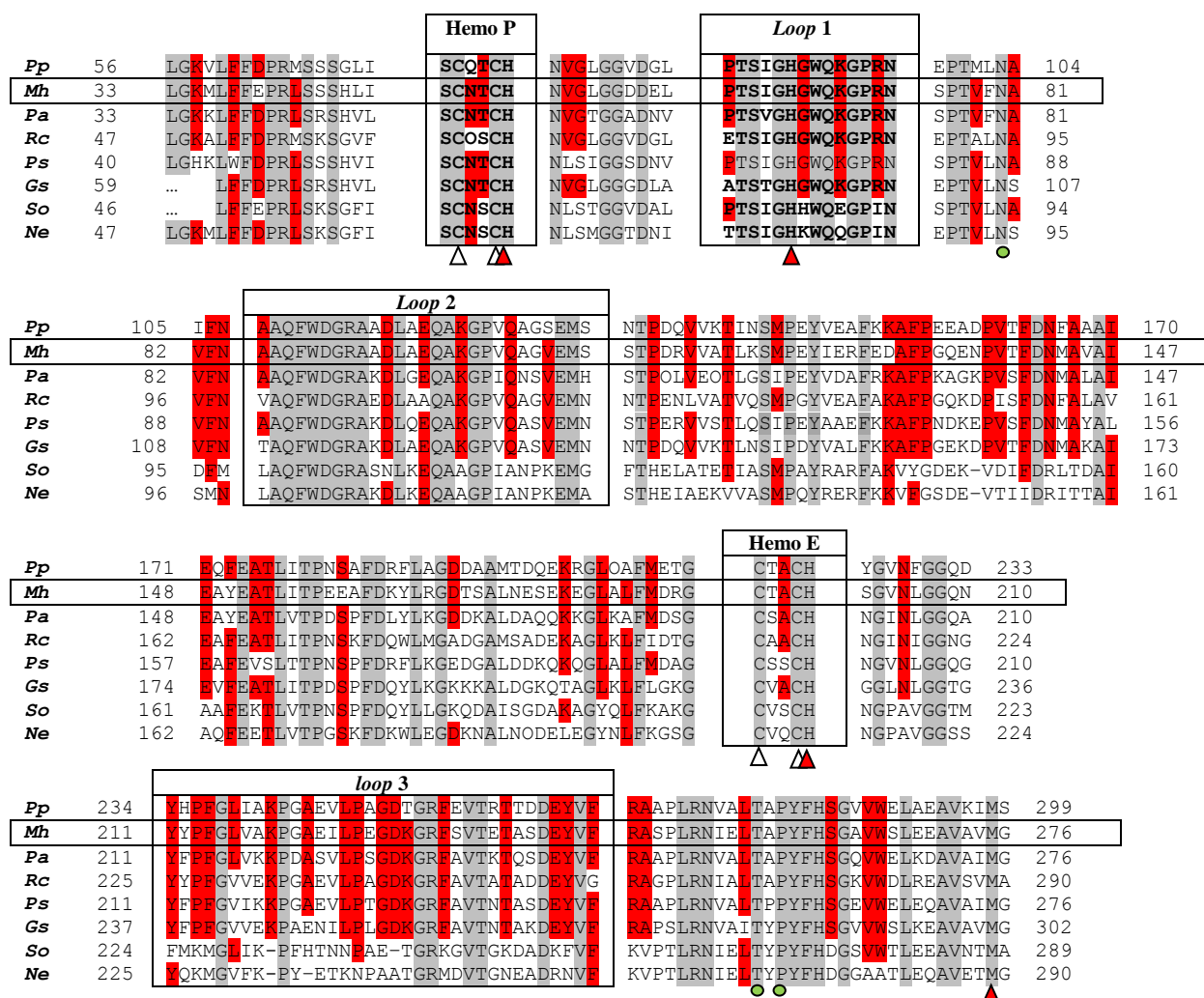


Figura 1.4 Alinhamento da sequência primária das peroxidases do citocromo *c* bacterianas mais estudadas: *Pa*, *Ps. aeruginosa*, *Pp*, *Pa. pantotrophus*, *Mh*, *Ma. hydrocarbonoclasticus*, *Ps*, *Ps. stutzeri*, *Rc*, *Rb. capsulatus*, *Gs*, *Gb. sulfurreducens*, *So*, *Sw. oneidensis* e *Ne Ni. europaea*. Os aminoácidos ligados aos hemos (CXXCH) estão indicados como hemo E (C-terminal) e hemo P (N-terminal). A cor cinzenta estão assinalados os aminoácidos conservados e a vermelho os semi-conservados. (▲) Ligandos H (histidina) e M (metionina) ao ferro hémico, (△) resíduos de cisteína covalentemente ligados ao hemo, (●) ligandos do íon cálcio. Figura adaptada das referências [65, 71, 75, 77 e 97].

Observando a Figura 1.4 é possível constatar que os resíduos conservados localizam-se nas proximidades dos hemos e nos *loops*, verificando-se uma diminuição de resíduos conservados entre a PCc de *Ni. europaea* e de *Pa. pantotrophus*. Pelas sequências de

alinhamento da estrutura primária é possível determinar a percentagem de sequências de resíduos comuns (Tabela 1.2)

Tabela 1.2 Percentagem de sequência de alinhamento idênticas¹
das estruturas primárias apresentadas na Figura 1.4

Bactérias	<i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i>	<i>Ni. europaea</i>
<i>Pa. pantotrophus</i>	73 %	46 %
<i>Ps. aeruginosa</i>	72 %	43 %
<i>Rb. capsulatus</i>	69 %	46 %
<i>Ps. stutzeri</i>	71 %	48 %
<i>Gb. sulfurreducens</i>	67 %	45 %
<i>Sw. oneidensis</i>	49 %	65 %
<i>Ni. europaea</i>	50 %	100%

(¹ <http://proteinstrutures.com/Sequence/Sequence/sequence-alignment.html>).

Pelos resultados apresentados na Tabela 1.2, confirma-se uma elevada percentagem de identidade, ou seja elevada similaridade nas sequências de aminoácidos, entre a estrutura primária da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, da PCc de *Pa. pantotrophus* (73 %), da PCc de *Ps. aeruginosa* (72 %) e da PCc de *Rb. capsulatus* (69 %). Comparando as sequências de resíduos idênticas da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* junto dos hemo e *loops*, podemos verificar que esta semelhança aumenta, sendo de 87 % para *Pa. pantotrophus* e de 80% para *Ps. aeruginosa* mas somente de 53% para *Ni. europaea*.

A percentagem de sequências idênticas entre a PCc de *Sw. oneidensis* e de *Ni. europaea* é de 60 %, mas somente de 44% entre a PCc de *Sw. oneidensis* e de *Ps. aeruginosa* [77, 97].

Verifica-se que, por exemplo, a homologia estrutural entre a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e a PCc de *Ps. aeruginosa*, considerando resíduos semelhantes, é de 80 % e que entre PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e a PCc de *Ni. europaea* é de 73% [71, 97]. Estes valores de homologia, revelam uma elevada percentagem de sequências semelhantes de aminoácidos e predizem estruturas terciárias semelhantes.

1.2.4 Estrutura das peroxidases do citocromo *c* dihémicas

As PCc são dímeros cuja estrutura terciária está organizada em dois domínios, cada um contendo um hemo tipo-*c*. Estudos espectroscópicos revelaram que estes dois hemo não são equivalentes, o que se reflecte nos seus diferentes papéis na activação e na catálise enzimática [42, 121- 123]. O hemo peroxidáctico (hemo P) encontra-se no domínio N-terminal e apresenta uma coordenação axial bis-histidina. O outro hemo (hemo E), encontra-se no domínio C-terminal e tem como ligandos axiais uma metionina e uma histidina.

Em virtude da diferente coordenação hémica, os potenciais formais dos dois hemo são diferentes, sendo possível a ocorrência de três estados de oxidação diferentes: PCc

completamente oxidada, PCc no estado de valência mista (com o hemo E reduzido) e PCc completamente reduzida [124- 126].

No estado oxidado, a metionina axial no hemo E não se encontra fortemente ligada e este encontra-se num equilíbrio spin-alto/spin-baixo [97]. Quando está reduzido, este hemo hexacoordenado apresenta-se numa configuração de spin-baixo [97].

O hemo P apresenta a configuração de spin-alto quando o ferro está coordenado axialmente por um ligando fraco, como a água, ou quando essa posição de coordenação está livre [53, 59, 65, 71, 75 e 125]. Quando está hexacoordenado com duas cadeias laterais de histidina, ou com outro ligando forte, apresenta-se numa configuração de spin-baixo [123, 124].

Na família das PCc verifica-se uma grande homologia na orientação dos dois hemos (posição aproximadamente perpendicular de um relativamente ao outro), no local de ligação do íon cálcio e do resíduo de triptofano localizado entre os dois hemos (Trp 94 em *Ma. hydrocarbonoclasticus*, em *Ps. stutzeri* e *Ps. aeruginosa* ou Trp 84 em *Ni. europaea* e Trp 97 *Rb. capsulatus*) bem como no próprio enrolamento dos dois domínios (Figura 1.5) [53, 59, 65, 71 e 75].

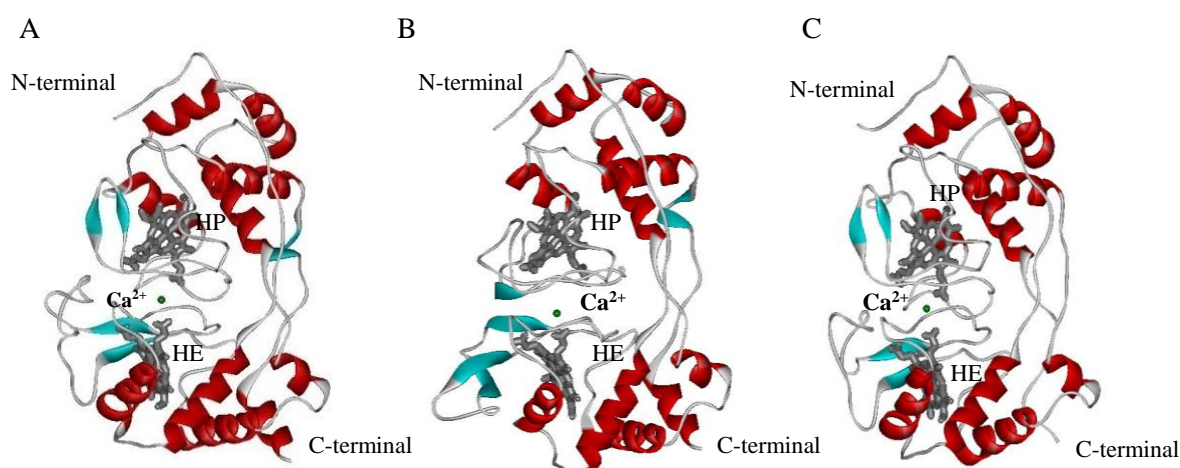


Figura 1.5 Estruturas da peroxidase do citocromo *c* de *Ps. aeruginosa* na forma oxidada (A) [PDB ID: 1EB7] e no estado de valência mista (B) [PDB ID: 2VHD] e de *Ni. europaea* (C) oxidada [PDB ID: 1IQC]. HE- hemo de transferência electrónica, HP- hemo peroxidáctico, esfera verde- íon cálcio. As PCc contêm dois domínios helicoidais, com um hemo tipo *c* covalentemente ligado via ligações tioeter a um motivo conservado CisXXCisHis. O hemo P está no domínio N-terminal e tem a coordenação bis-histidina, enquanto o grupo hémico ligado ao C-terminal tem a coordenação metionina-histidina. Figuras preparadas com o software Accelrys Viewerlite.

Os átomos de ferro encontrarem-se a uma distância de aproximadamente ~ 20 Å e os grupos propionato encontram-se a uma distância menor (~ 10 Å) (Figura 1.6) [97, 127]. O íon cálcio localiza-se na interface dos domínios (Figura 1.5 e Figura 1.6), a qual é tipicamente hidrofóbica [43, 53, 59, 65 e 71]. Na PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* o íon cálcio é

coordenado por sete ligandos, quatro moléculas de água e três átomos de resíduos da cadeia polipeptídica, o C=O da treonina (256) e da prolina (258) e pelo O δ 1 da asparagina (79), apresentando uma geometria bipiramidal pentagonal [71]. Um dos propionatos do hemo E estabelece pontes de hidrogénio com duas das moléculas de água que coordenam o ião cálcio [65, 71].

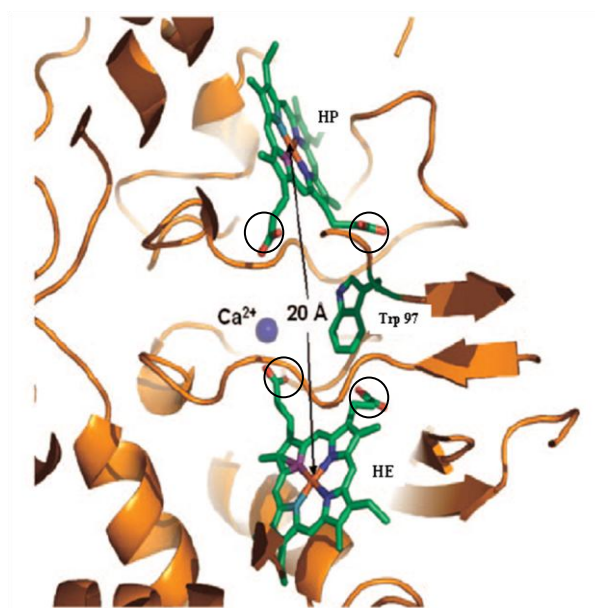


Figura 1.6 Posição do hemo E, do hemo P e do triptofano 97, bem como do ião cálcio na estrutura cristalina de *Rb. capsulatus*. A distância entre os ferros hémicos é aproximadamente 20 Å e a distância entre os grupos propionatos é de 10 Å. Os grupos propionatos encontram-se circundados e o triptofano 97 identificado. Figura retirada da referência 65.

Nas estruturas de PCc *Ma. hydrocarbonoclasticus* [71] e *Ps. aeruginosa* [43] no estado de valência mista, a carga do ião cálcio não é compensada pelos grupos carregados negativamente, tendo sido proposto que uma das funções deste ião poderá ser a modulação da transferência de electrões entre os dois domínios, sendo importante para a alteração conformacional que se observa entre a forma oxidada e a de valência mista [43, 71].

Na maioria das estruturas tridimensionais de PCc dihémicas, a enzima está no estado oxidado, apresentando quase todas, à excepção de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* obtida a pH 4,0, um ião cálcio na interface dos dois domínios (*Ni. europaea*, *Rb. capsulatus*, *Ge. sulfurreducens*) [59, 65, 71 e 75]. Obteve-se também a estrutura da PCc de *Pa. pantotrophus*, *Rb. capsulatus* e de *Ps. aeruginosa* no estado de valência mista (hemo E reduzido) e a estrutura da PCc de *Sw. oneidensis* no estado completamente reduzido com o ião cálcio incorporado entre os dois domínios [43, 53, 75 e 77].

Comparando a estrutura cristalina das diferentes PCc oxidadas verifica-se que são semelhantes nas proximidades do hemo E e do hemo P (Figura 1.7), sendo praticamente sobreponíveis nesses locais [43, 53 e 65].



Figura 1.7 Sobreposição de estruturas de PCc bacterianas. A verde apresenta-se a estrutura da PCc na forma oxidada de *Rb. capsulatus* (1ZZH) a cor vermelha a estrutura da PCc de *Ps. aeruginosa* na forma oxidada (1EB7) e a azul a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma fechada (1RZ6). Assinalado a preto encontra-se o *loop I* já referido na Figura 1.4. Figura retirada de referência 65.

Na forma oxidada das PCc, com a exceção da PCc de *Ni. europaea* [59], o hemo P encontra-se hexacoordenado. No estado de valência mista ou completamente reduzida o hemo P encontra-se pentacoordenado, apresentando uma posição de coordenação disponível para ligar o substrato [43, 53, 59, 65, 71, 75 e 77].

A estrutura tridimensional da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* determinada por cristalografia de raios - X, na forma fechada obtida a pH 4,0, apresenta o hemo P hexacoordenado mas não o íon cálcio (Figura 1.8-A). A forma aberta desta PCc obtida a pH 5,3, também alcançada com a mesma técnica, apresenta o íon cálcio localizado entre os dois domínios e o hemo P pentacoordenado (Figura 1.8-B) [71]. Esta estrutura aberta, identificada como sendo a conformação activa da enzima, foi a primeira em que claramente se mostrou que um dos hemos perde um ligando, ficando acessível ao substrato, apoiando a hipótese proposta por Pettigrew e colaboradores que tinha sido formulada com base em estudos espectroscópicos de RPE, RMN e UV/visível [71, 97].

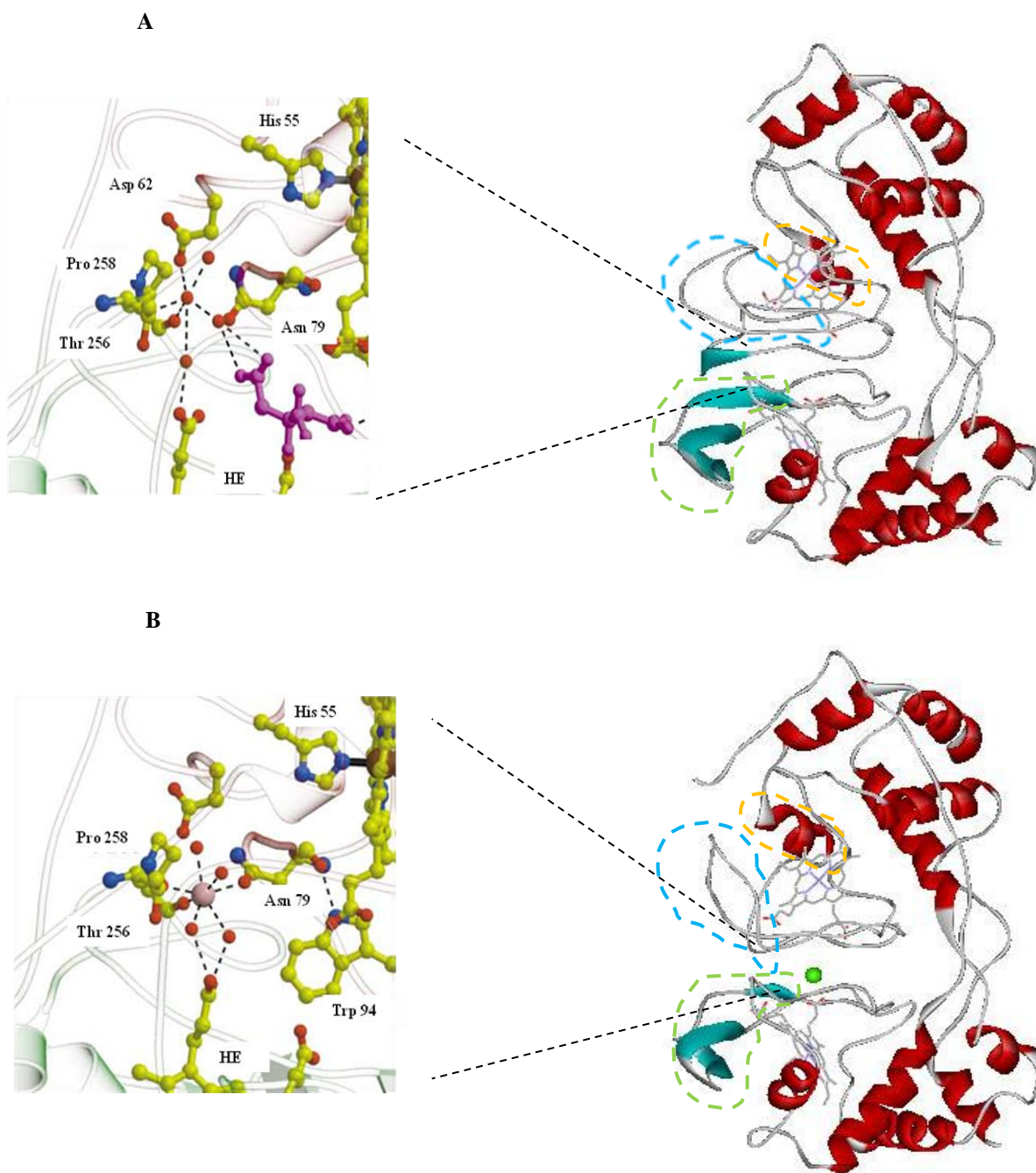


Figura 1.8 Estrutura da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na (A) forma fechada e sem cálcio a pH 4,0 [PDB: IRZ6] e (B) forma aberta com cálcio a pH 5,3 [PDB: IRZ5], onde se mostra a ampliação da cavidade entre os domínios da PCc. Cada hemo está localizado num domínio (C ou N-terminal); o triptofano e o cálcio (esfera verde na estrutura e a rosa na ampliação) estão localizados na interface hidrofóbica entre os dois domínios. Na forma fechada (A) o hemo P apresenta uma coordenação bis-His, estando a cavidade entre os domínios ocupada por uma molécula de água (a vermelho) coordenada com quatro moléculas de água e três resíduos (treonina, aspergina e prolina); o hemo E apresenta uma coordenação Met-His. Na forma aberta (B) o hemo P apresenta-se penta coordenado e o hemo E apresenta-se hexacoordenado com uma coordenação Met-His e o ião cálcio encontra-se coordenado com quatro moléculas de água e três resíduos (treonina, aspergina e prolina). Em (B) indicam-se os *loops* 1 (aminoácidos 80-92, circundado a azul), 2 (aminoácidos 105-132, circundado a amarelo) e 3 (aminoácidos 225-257, circundado a verde) que encontram-se circundados, bem como o hemo (HE- hemo de transferência de electrões; HP- hemo peroxidático) e o ião cálcio (esfera verde). Asp-ácido aspártico, Asn-asparagina, Thr-treonina, Pro-prolina. As figuras da estrutura tridimensional da PCc foram preparadas com Accelrys Viewerlite e as ampliações (imagens do lado esquerdo) foram retiradas da referência 71.

No entanto, a interpretação destas duas estruturas levanta algumas dúvidas [53, 97], já que a estrutura cristalina da forma que contém cálcio é diferente da estrutura cristalina da forma oxidada e activa da PCc de *Ni. europea* e da estrutura cristalina da forma activa de valência mista da PCc de *Pa. pantotrophus*. Nestas últimas, o ácido glutâmico (E114, localizado no loop 2) está direccionado para o solvente e posicionado de forma a poder clivar a ligação O-O do peróxido de hidrogénio, o que não acontece na forma aberta da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* [53, 71]. Verifica-se ainda que a conformação das cadeias junto do hemo P na forma aberta da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, onde esta se encontra em valência mista, assemelha-se mais à forma oxidada da *Pa. pantotrophus* do que à forma de valência mista da mesma [53, 71 e 97].

O facto da forma cristalina não ter sido reduzida por ascorbato a pH 5,3 (os cristais foram reduzidos pela radiação de sincrotrão durante a experiência), levou à hipótese desta conformação ser consequência das condições de cristalização e não da activação reductiva (a cristalização ocorreu a um baixo pH) [53, 97]. A pH 4,0 o ião cálcio não está incorporado na estrutura, mesmo quando presente no meio, o que também pode ser resultado de alterações na cavidade onde este ião se liga [53, 97].

1.2.5 Caracterização bioquímica

As PCc bacterianas dihémicas, tal como foi anteriormente referido, são enzimas homodiméricas, com hemos do tipo *c*, cuja massa molecular monomérica é cerca de 35 kDa.

O hemo E é reduzido com ascorbato de sódio em presença de DAD, mas o hemo P só se reduz com ditionito de sódio, o que mostra a não equivalência dos hemos [46, 97, 128- 131]. O hemo peroxidáctico (hemo P) na forma oxidada tem a coordenação axial bis-histidina e um potencial de redução que varia entre -100 mV e -300 mV (Tabela 1.3) [97, 125]. O hemo E, hemo de transferência electrónica, no estado oxidado está coordenado axialmente por uma metionina e uma histidina e tem um potencial de redução, que varia entre +176 mV e +450 mV para as diferentes enzimas estudadas (Tabela 1.3) [97, 125].

Realizaram-se estudos cinéticos utilizando doadores de electrões fisiológicos e não-fisiológicos, como o citocromo *c* de cavalo ou ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) respectivamente, verificando-se que as constantes catalíticas, obtidas utilizando um doador fisiológico de electrões, variam entre 2400 min⁻¹ para a PCc de *Rb. capsulatus* e 116000 min⁻¹ para a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Os resultados da actividade catalítica de enzimas como a PCc de *Ps. stutzeri* e a PCc de *Pa. pantotrophus* mostram que a mesma depende não só do doador de electrões utilizado como também do tratamento prévio da enzima (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Propriedades bioquímicas de peroxidase do citocromo *c* bacterianas periplásmicas

Bactérias [Ref.]	Massa molecular do monómero (kDa)	Estrutura cristalina (estado redox e código PDB - ID)	Activação		Actividade enzimática		Doador de electrões (concentração do doador de electrões*)	V _M * (min ⁻¹)	K _M * (μM)	Potenciais formais (mV)		
			Adição de Ca ²⁺	pH do estudo	Adição de Ca ²⁺	pH óptimo				Hemo E	Hemo P	pH
<i>Pa. pantotrophus</i> [45- 47, 50, 51 e 53]	37,5	valência mista: 2C1V oxidada: 2C1U	+	7,5 6	+	6,0	pseudoazurina Cit c ₅₅₀	85000	13,0	+226 com Ca ²⁺ +176 sem Ca ²⁺	[-200 a -100]	6,5 Com e sem Ca ²⁺
<i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> [70 e 71]	36,5	activa: IRZ6 inactiva: IRZ5	+	7,5	+	-	Cit c ₅₅₂ (6,4 μM)	116000	122,0	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i> [41- 44]	36,2	oxidada: 1EB7 valência mista: 2VHD	+	6	n.d.	6	Cit c ₅₅₁ (13 μM) azurina	42600 40200	6,0 125,0	+320 com Ca ²⁺	-330	7,5 com Ca ²⁺
<i>Ps. stutzeri</i> [55- 58]	36,2	-	-	7,5	+	7,0	Cit c ₅₅₁ (7 μM) Cit c cavalo (7 μM)	4440 s/ Ca ²⁺ 4600 c/ Ca ²⁺ 3390 c/ Ca ²⁺ 5994 s/ Ca ²⁺	54,0 11,8	-	-	-
<i>Sw. oneidensis</i> [77- 79]	-	reduzida: 3O5C	n.d.		n.d.		Cit c ₅ (4 μM)	4380	0,3	-	-	-
<i>Rb. capsulatos</i> [63- 67]	36,2	oxidada: 1ZZH	+	-	+		Cit c ₂ (18 μM)	2400	33,0	+270 com Ca ²⁺	[-310 a -190]	7,5, Com Ca ²⁺
<i>Ge. sulfurreducens</i> [75 e 76]	73,9 (dímero)	oxidada: 3HQ6	-	8	-	5,5	ABTS	-	6,2	-	-	-
<i>Ni. europaea</i> [59- 62]	44,0	oxidada: 1IQC	-	5-9	n.d.	-	n.d.	-		+450	-260	7 Sem Ca ²⁺
<i>Mc. capsulatos</i> [68 e 69]	35,8	-	-	-	-	7	Cit c ₅₅₅ (9 μM)	3000	0,51	+432	-254	7 Com e sem Ca ²⁺

* Ensaio por espectroscopia de UV-visível
n.d. não determinado

1.2.6 Espectroscopia de absorção UV-visível

O espectro de absorção da forma oxidada das PCc apresenta um pico de Soret a um comprimento de onda de aproximadamente 407 nm, uma banda entre 527 e 550 nm (banda α/β oxidada) e, com a exceção da PCc de *Sw. oneidensis*, uma banda fraca entre 620 e 640 nm. O sinal nesta última banda indica a presença de um hemo férrico em spin-alto. A adição de ascorbato de sódio e do mediador redox DAD à solução com PCc oxidada, promove a redução do hemo E (PCc em estado de valência mista) o que resulta no espectro do visível num desvio do pico de Soret para valores entre 411 e 420 nm e, simultaneamente o aparecimento de um ombro entre 398 e 407 nm (originado pelo hemo P que permanece oxidado). Observa-se, ainda, o surgimento de dois picos (α e β) e o desaparecimento da banda entre 620 e 640 nm, com a exceção da PCc de *Sw. oneidensis*, onde esta última banda surge. O desaparecimento da banda entre 620 e 640 nm indica que o sinal de spin-alto da enzima totalmente oxidada é devido ao hemo E que, no estado de valência mista, se encontra reduzido [46- 48, 97, 121- 125]. Estas características podem ser observadas no espectro de absorção no visível da PCc de *Pa. pantotrophus* (Figura 1.9)

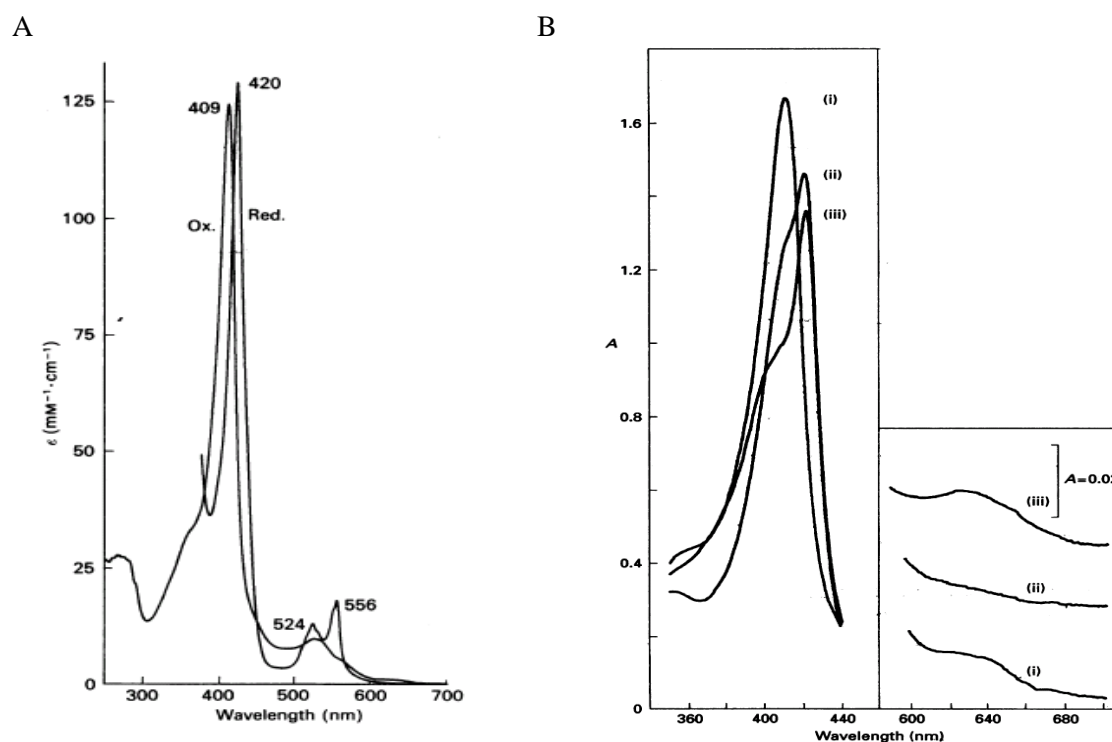


Figura 1.9 (A) Espectro de absorção da PCc de *Pa. pantotrophus* oxidada (Ox.) e completamente reduzida (Red). (B) Espectro de absorção da enzima (i) oxidada, (ii) após a adição de ascorbato de sódio (PCc em valência mista) e (iii) após a adição de CaCl_2 . Espectros retirados da referência 46.

Em algumas PCc como é o caso da de *Pa. pantotrophus*, verifica-se que após a adição de íons cálcio à forma de valência mista, surge uma banda de absorção entre 620 e 640 nm, indicando que o

hemo P está em configuração de spin-alto (Figura 1.9-B). A adição de ditionito à solução provoca a redução total da PCc, originando o desvio do pico de Soret para a zona do vermelho e o desaparecimento do ombro entre 398 e 407 nm. O aumento da intensidade dos picos α e β , indica que ambos os hemos se encontram num estado ferroso (Figura 1.9-A).

1.2.7 Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE)

A espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica permite estudar centros metálicos em que o metal se apresenta na configuração paramagnética, ou seja, com um electrão desemparelhado. O parâmetro g dos espectros de RPE é utilizado para caracterizar as configurações destes centros metálicos, sendo uma medida da interacção entre o campo magnético aplicado na amostra e o campo magnético de spin [132- 142].

Os espectros de RPE das PCc caracterizam-se por valores típicos de g no estado oxidado, sendo possível observar que o hemo E na configuração de spin-baixo ($d_{xy}^2 d_{xz}^2 d_{yz}^1$) com coordenação metionina-histidina, se caracteriza por um valor de g_z entre 3,23 e 3,41 e que o hemo P na configuração de spin-baixo ($d_{xy}^2 d_{xz}^2 d_{yz}^1$) com coordenação bis-histidina se caracteriza por valores de g_z entre 2,79 e 3,0, g_y entre 2,21 e 2,38 e g_x entre 1,30 e 1,58. No estado de valência mista deixa de se observar o sinal de g_z entre 3,23 e 3,41. Após a adição de iões cálcio à forma de valência mista, o espectro apresenta alteração nos sinais de RPE, que apesar de serem típicos de um hemo de spin baixo se atribuem à modificação na coordenação do hemo P, que agora apresenta os valores g_z entre 2,78 e 2,94, g_y entre 2,21 e 2,40 e g_x entre 1,46 e 1,58 [46- 49, 58, 77 e 128]. No espectro de RPE da PCc de *Pa. pantotrophus* é possível observar estas características (Figura 1.10) [46].

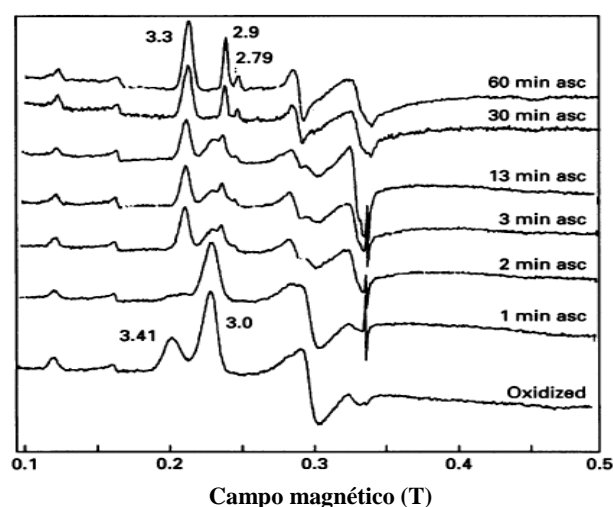


Figura 1.10 Espectro de RPE da PCc de *Pa. pantotrophus* (337 μ M) oxidada e a vários tempos após a incubação com ascorbato de sódio em tampão fosfato 1 mM (pH 7) e NaCl 10 mM, à temperatura de 8 K. Espectros retirados da referência 46.

1.2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear estuda as alterações na absorção da radiação electromagnética por núcleos magnéticos, após aplicação de um campo magnético externo fixo. Um dos parâmetros que caracteriza um espectro de ^1H -RMN é o desvio químico (δ) [143- 149].

A forma oxidada de um citocromo tipo *c* de spin-baixo é paramagnética ($S = 1/2$), pelo que as ressonâncias dos prótons meso ou perto do hemo (prótons dos grupos metilo dos hemos) surgem desviadas para campo baixo (60 a 9 ppm) (Figura 1.11) [46, 55, 149- 151]. A campo magnético alto (0 e -20 ppm) surgem normalmente ressonâncias dos metilos dos ligandos axiais, nomeadamente da metionina axial nos citocromos histidina-metionina.

A forma reduzida de um citocromo tipo *c* de spin-baixo é diamagnética ($S = 0$). Os prótons de resíduos da cadeia polipeptídica e dos ligandos axiais do hemo, situados no interior do anel porfirínico, sofrem desvios para campos altos, surgindo as respectivas ressonâncias entre 0 e -5 ppm, não se diferenciando.

Os espectros de ^1H -RMN, de uma PCc totalmente oxidada, apresentam dois grupos de ressonâncias a campo baixo, um entre 20 e 35 ppm e outro entre 50 e 70 ppm. O grupo de ressonâncias entre 20 e 35 ppm é atribuído ao hemo P que se encontra em spin-baixo. As ressonâncias entre 50 e 70 ppm correspondem aos metilos do hemo E em equilíbrio de spin [46, 55, 149- 152]. As PCc na forma de valência mista apresentam um conjunto de ressonâncias desviadas para campo baixo, entre 50 e 70 ppm, correspondentes ao hemo P no estado férrico em spin-alto (Tabela 1.4) [46, 55, 150- 152]. No espectro de ^1H -RMN da PCc de *Pa. pantotrophus* é possível observar as características descritas anteriormente (Figura 1.11) [46].

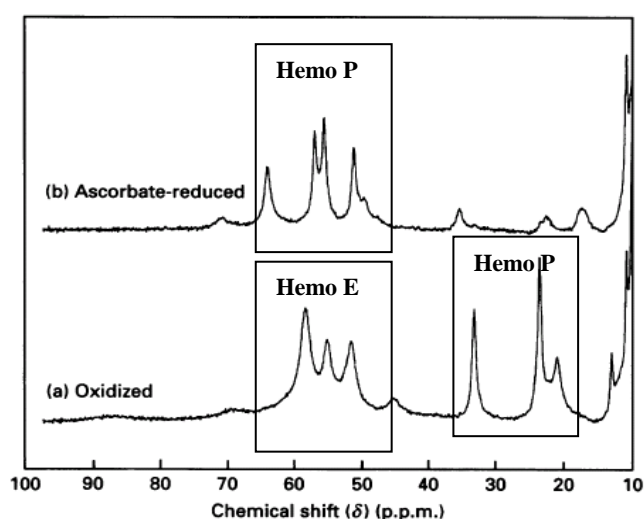


Figura 1.11 Espectro de ^1H -RMN da PCc de *Pa. pantotrophus* nas forma oxidada (a) e em valência mista (b), na ausência de cálcio. Espectros retirados da referência 46.

Tabela 1.4 Propriedades espectroscópicas de peroxidase do citocromo *c* bacterianas.

Organismo (Ref.)	Espectroscopia UV visível Máximos de absorção (nm)			Espectroscopia de RPE Valores de g				Espectroscopia de ¹ H-RMN Valores de δ (ppm)						
	Oxidada	Valência mista		Reduzida	Oxidada		Valência mista Hemo P		Oxidada		Valência mista			
		Sem Ca ²⁺	Com Ca ²⁺		Hemo E	Hemo P	Sem Ca ²⁺	Com Ca ²⁺	Hemo E	Hemo P	Sem Ca ²⁺ Hemo E	Hemo P	Com Ca ²⁺ Hemo E	Hemo P
<i>Pa. pantotrophus</i> [46, 47, 50, 51 e 131]	409, 527, 640	409 (ombro), 419, 525, 557	409 (ombro), 419 525, 557, 640	–	g _z = 3,41	3,00, 2,27, 1,44	2,89, 2,32, 1,51 (espécie I) 2,78, 2,40, 1,58 (espécie II)	2,89, 2,32, 1,51	58,2, 55,0 e 51,5	33,2 23,8	–	64,0, 57,0, 55,5, 51,0	–	59,3 56,1 52,2
<i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> [70]	407, 527, 640	406 (ombro), 417, 524,556	397 (ombro), 419, 524, 556, 640	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ps. aeruginosa</i> [41, 42 e 44]	407, 525, 640	407 (ombro) 420, 524, 557, 640 (ombro)	–	420,524, 551(ombro) 557	g _z = 3,26 (Met-His)	2,94 (His-His), 2,24, 1,42	2,83, 2,35, 1,54	–	Entre 45 e 65	19,5, 21,5	–	45 a 65	–	–
<i>Ge. sulfurreducens</i> [75 e 76]	406,5, 530, 620	411, 523, 553 630	418, 523, 553	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Rb. capsulatos</i> [63- 67]	406, 530, 630	420, 525, 556, 630	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ps.stutzeri</i> [55- 58]	408,528, 630	408 (ombro), 418, 524, 558, 630	408 (ombro) 418, 524, 558, 630	418, 524, 558	g _z = 3,39 (Met-His)	3,01 (His-His), 2,29,1,41	2,94, 2,33, 1,46 g _z = 2,89 (minoritário)	2,94, 2,33, 1,46 g _z = 2,89 (minoritário)	69,3, 64,1, 57,3, 55,9	22,7, 32,0	–	62,0, 55,9, 55,1, 53,5	–	–
<i>Sw. oneidensis</i> [77- 79]	407, 540, 553	417, 540, 553, 640		–	3,0, 2,21, 1,30	2,87, 2,36, 1,51	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Mc. capsulatos</i> [68 e 69]	409, 540, 630	407 (ombro), 419, 526, 556, 625	–	–	420, 526,556	3,23 2,02, 1,80	2,79, 2,40, 1,58	2,79, 2,40, 1,58	–	–	–	–	–	–
<i>Ni. europaea</i> [60- 62]	408, 550, 630	418, 524,554	–	–	–	g _z = 3,38	2,86, 2,38, 1,49 (espécie I) 2,81, 2,38, 1,54 (espécie II)	2,86, 2,38, 1,49 (espécie I) 2,81, 2,38, 1,54 (espécie II)	–	–	–	–	–	–

* Ferro paramagnético, SB-spin-baixo, SA-spin-alto, Hemo E - hemo de transferência electrónica, Hemo P - hemo peroxidático

1.2.9 O mecanismo de activação

O mecanismo de activação das PCc bacterianas, bem como a função do ião cálcio no mesmo, tem sido objecto de vários estudos nos últimos anos [41- 43, 48, 49, 53, 59, 65, 67 e 70]. A maioria das PCc requer activação redutora [58, 65, 70, 75, 77 e 126], no entanto um pequeno número de enzimas, onde se incluem as PCc isoladas de *Ni. Europaea* [60] e de *Mc. capsulatus* [69] não requer activação para atingir o máximo de actividade.

As PCc isoladas de *Ni. europaea* [59, 60] e de *Mc. Capsulatus* [68, 69] têm actividade catalítica tanto na forma oxidada como na forma de valência mista. A ligação de aniões como o ião cianeto ou hidroxilamina à forma oxidada destas enzimas, bem como a manutenção de spins dos hemos no estado de valência mista, mostram que o hemo peroxidático (HP) está pentacoordenado na forma oxidada, ou seja, apresenta a posição axial livre para a ligação do substrato (peróxido de hidrogénio) [59, 60, 68, 69 e 97]. Comparando a estrutura activa da PCc de *Ni. Europaea* com a inactiva da PCc de *Ps. aeruginosa*, ambas no estado oxidado, verifica-se que embora junto ao hemo E as conformações das PCc sejam semelhantes, o mesmo não acontece nas proximidades do hemo P (Figura 1.12). No caso da PCc de *Ni. Europaea* o *loop 1* da cadeia proteica contendo a His 59 tem uma conformação que permite que o substrato se ligue directamente ao hemo peroxidático mesmo no estado oxidado [43, 53, 59, 65 e 71] (Figura 1.12).

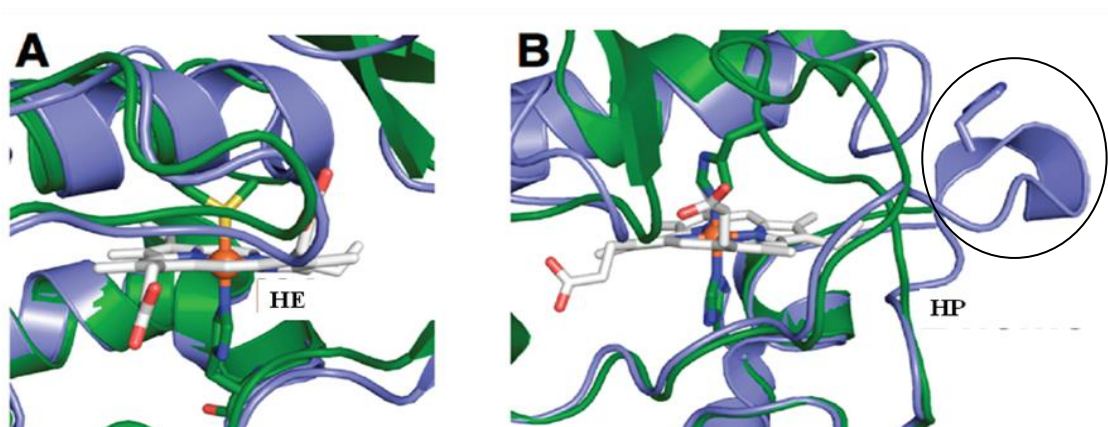


Figura 1.12 Comparação das estruturas de PCc nos estados inactivos (verde) e das estruturas activas (azul), focando os resíduos que envolvem o hemo E (A) e que envolvem o hemo P (B). A PCc de *Ps. aeruginosa* está representada a verde tal como é isolada (forma inactiva) (código do PDB: 1EB7) e a azul representa-se a PCc de *Ni. europaea* como é isolada (forma activa) (código do PDB: 1IQC). O *loop 1* encontra-se circundado a preto. Figura retirada da referência 59.

O conhecimento das estruturas cristalinas no estado oxidado e em valência mista das PCc de *Ps. aeruginosa* [43], *Ni. europaea* [59], *Ma. hydrocarbonoclasticus* [71], *Pa.*

pantotrophus [53] e *Rb. capsulatus* [65] permitiram identificar algumas alterações estruturais que deverão ocorrer durante a activação.

Verifica-se que na conversão da forma inactiva em forma activa, os *loops* 1, 2 e 3, têm um papel determinante na alteração estrutural sofrida pelas PCc (Figura 1.13).

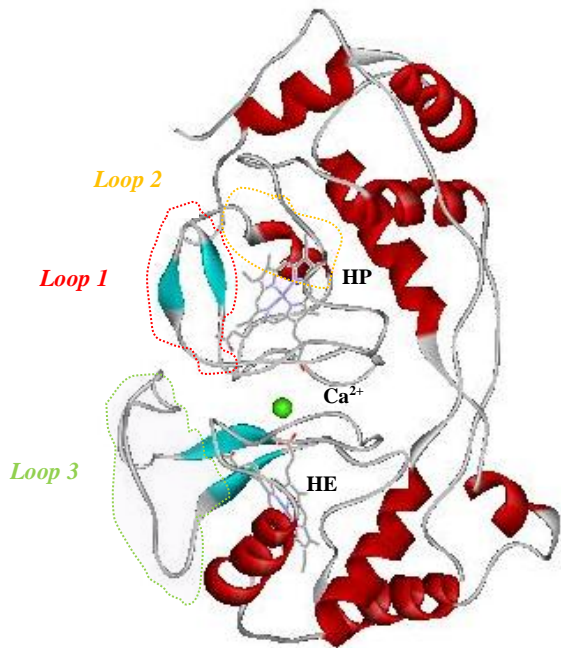


Figura 1.13 Estrutura da PCc de *Ni. europaea* como é isolada (forma activa) (código do PDB: 1IQC), onde se identificam os *loops* 1 (aminoácidos 80-92, circundado a vermelho), 2 (aminoácidos 105-132, circundado a amarelo) e 3 (aminoácidos 225-257, circundado a verde) que encontram-se circundados, bem como o hemo (HE- hemo de transferência de electrões; HP- hemo peroxidáctico) e o ião cálcio (esfera verde). Figura preparada com Accelrys Viewerlite.

Verifica-se ainda que, para algumas PCc no estado de valência mista, a capacidade de catalisar peróxido de hidrogénio depende da quantidade de iões cálcio presente no meio [48, 53, 70 e 97]. Com base na existência ou ausência de actividade catalítica na forma oxidada, as PCc bacterianas dihémicas podem ser agrupadas em dois conjuntos, que se podem ainda subdividir tendo em conta a necessidade de iões cálcio para a sua activação (Tabela 1.5).

Tabela 1.5 Condições de activação das peroxidases do citocromo c bacterianas.

Activação da peroxidase do Citocromo c		Bactéria [Ref.]
Necessita de pré-redução	Necessita da adição de iões cálcio para a activação	<i>Pa. pantotrophus</i> [46- 48] <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> [70]
	Não requer a adição de iões cálcio para a activação	<i>Ps. aeruginosa</i> [42, 43] <i>Ps. stutzeri</i> [58] <i>Rb. capsulatus</i> [65- 67] <i>Gb. sulfurreducens</i> [75] <i>Sw. oneidensis</i> [77, 78]
Não necessita de pré-redução	Não necessita de iões cálcio para a activação	<i>Ni. europaea</i> [59, 60] <i>Mc. capsulatus</i> [69]

Embora se reconheça a importância do cálcio na activação, esta necessidade e a função do mesmo ainda não foram inequivocamente explicadas. Inicialmente foi proposto que era necessário o ião cálcio localizar-se na interface dos domínios para a correcta orientação da cadeia lateral do triptofano (Trp-94 para a PCc de *Ps. aeruginosa* [41- 43] e para a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* [71]; Trp-84 para a PCc *Ni. europaeae* [59]; Trp-97 para a de *Rb. capsulatus* [65]) o que facilitava a transferência electrónica entre os dois hemos, sendo por isso essencial à actividade catalítica. De modo a esclarecer a função do ião cálcio no mecanismo de activação, fizeram-se estudos de mutagénese nas PCc de *Rb. capsulatus*, *Ps. aeruginosa* e *Ni. europaea* [41, 44, 65 e 67]. Utilizando técnicas de absorção electrónica e de espectroscopia RPE, constatou-se que, quando uma forma recombinante da PCc de *Ps. aeruginosa* está na forma de valência mista na ausência de cálcio, o hemo P permanece hexacoordenado, o que impede a ligação do substrato, e por isso, esta forma não apresenta actividade catalítica [44]. Em estudos com as PCc de *Pa. pantotrophus*, de *Ps. aeruginosa* [44, 48, 49 e 53] e de *Rb. capsulatus* [65 e 67] utilizando espectroscopia de visível, espectroscopia de ^1H -RMN e estudos cristalográficos, encontraram-se evidências que o local de ligação ao ião cálcio se situa na interface entre os dois domínios [53, 71 e 128]. Pela análise das estruturas de *Ma. hydrocarbonoclasticus* [71] e de *Pa. pantotrophus* [53] confirmou-se que o ião cálcio estará na origem das alterações conformacionais nas interfaces dos monómeros o que contribuiu para a forte ligação entre os mesmos. A ligação do ião cálcio favorece assim as alterações estruturais nas proximidades do hemo P, que no estado férrico perde um ligando axial (histidina) passando da configuração de spin-baixo para a configuração de spin-alto e que também altera a orientação dos grupos propionatos essenciais à transferência de electrões entre hemos [44, 53 e 128].

A proposta vigente sobre o mecanismo de activação é de que este se inicia com a redução do hemo E pelo parceiro fisiológico (citocromo *c* ou cupredoxina), ficando aquele na configuração de spin-baixo [61, 62, 67 e 68]. Esta redução leva a uma alteração conformacional do *loop 1* e *3* (Figura 1.8) e principalmente na região junto ao hemo P (*loop 2*), envolvendo a alteração da coordenação do ferro hémico deste hemo, de hexacoordenado para pentacoordenado, por saída de uma histidina axial [71, 97, 123 e 128]. O *loop 2* a que está ligada esta histidina move-se em direcção á superfície da enzima, ficando a histidina exposta ao solvente, permitindo esta alteração conformacional a entrada de peróxido de hidrogénio na cavidade do hemo peroxidático[53].

1.2.10 A catálise enzimática

A catálise enzimática ocorre, quando a enzima está activada e em presença de peróxido de hidrogénio. A representação da activação reductiva e do mecanismo de catálise das PCc bacterianas é apresentado na Figura 1.14.

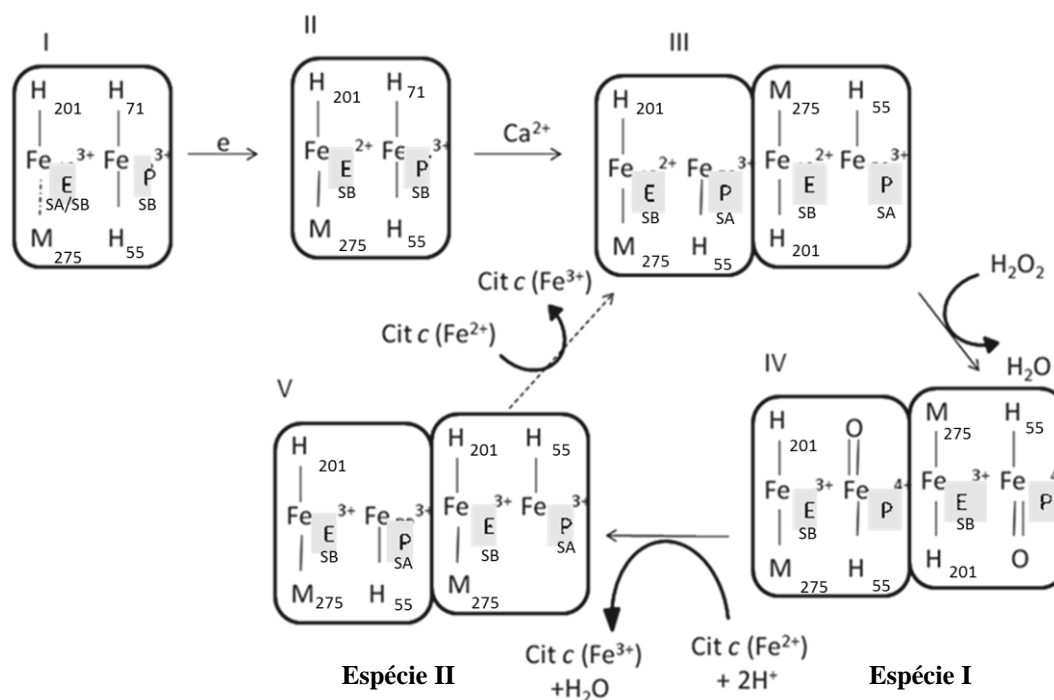


Figura 1.14 Esquema da activação reductiva e do mecanismo do ciclo catalítico de PCc bacterianas, onde se apresenta a regeneração do citocromo c durante a catálise do peróxido de hidrogénio. E- hemo de transferência electrónica, P- hemo catalítico, SA- spin alto, SB- spin baixo e SA/SB- equilíbrio de spins. Esquema adaptado das seguintes referências 41, 42, 49, 58, 65, 71 e 76.

A activação (Figura 1.14-I a III) ocorre inicialmente por redução do hemo E que passa do estado férrico para o estado ferroso. Após a ligação do peróxido ao hemo P, o electrão necessário à quebra da ligação O-O do peróxido é doado pelo hemo E, que assim passa novamente ao estado férrico, e o outro é doado pelo hemo P formando-se um intermediário oxiferril (Fe(III)_E~Fe(IV)_P=O) (espécie I) (Figura 1.14-IV) e a espécie II (Fe(III)_E~Fe(III)_P, Figura 1.14-V) [41, 42, 53, 59, 122, 153 e 154]. A espécie II apresenta uma conformação diferente da forma nativa uma vez que o hemo P está pentacoordenado. Evidência destas espécies surgem de experiências de RPE com *Ps. aeruginosa* [122- 124], onde o sinal de $g_z = 3,15$ é consistente com a coordenação His-Met de hemo E no estado férrico em spin-baixo [42, 128, 154].

Foi proposto que a transferência electrónica entre os dois centros hémicos, durante a catálise, ocorra através dos grupos propionato, que se encontram a aproximadamente 10 Å e do triptofano (Trp 94 em *Ma. hydrocarbonoclasticus*, em *Ps. stutzeri* e *Ps. aeruginosa*, Trp 84 em *Ni. europaea* e Trp 97 para *Rb. capsulatus*) [53, 65, 71 e 97]. Estudos com mutantes identificaram o triptofano como um aminoácido essencial para a transferência de electrões [53, 65, 71 e 97].

Estudos com mutantes de PCc de *Rb. capsulatus* permitiram identificar resíduos essenciais para a catálise [65]. Nestes estudos, substituiu-se o ácido glutâmico (Glu 117) por

uma histidina ou uma lisina, na expectativa de se detectar alteração da actividade com o pH. Os mutantes referidos não apresentam actividade em toda a gama de pH estudado, não sendo detectado o sinal de spin-alto na forma de valência mista ou na forma completamente reduzida [65], o que indica que o hemo P permaneceu hexacoordenado. Ao substituir-se o ácido glutâmico 117 (Glu 117) por uma leucina verificou-se que este mutante, embora apresente propriedades espectroscópicas semelhantes à PCc na forma nativa, não catalisa o peróxido de hidrogénio [65]. Estudos mutagénicos, em que o resíduo Glu 117 foi substituído por uma fenilalanina, mostraram uma diminuição da actividade catalítica e, a substituição daquele resíduo por uma alanina inactivou a enzima [41, 65]. Estes resultados validam a hipótese do resíduo Glu 117 ser necessário para a catálise [44, 62 e 130]. De facto, o ácido glutâmico está situado no *loop* 2, próximo do local de ligação do peróxido de hidrogénio e na conformação aberta e activa das peroxidases de *Ps. aeruginosa* e *Ni. europaea* este resíduo está localizado na mesma posição e a curta distância do átomo de ferro do hemo P [43, 53 e 59] o que valida a proposta de que este aminoácido seja necessário à quebra da ligação O-O no peróxido de hidrogénio. Também se substituiu a glutamina Gln-107 por uma leucina tendo a PCc mutante de *Rb. capsulatus* deixado de catalisar [65]. De realçar que tanto o glutamato como a glutamina estão no mesmo *loop* flexível estando localizados a uma distância de 5,1 Å e 4,1 Å respectivamente do ferro hémico do hemo P [53, 65].

Em estudos de mutagénesis alterou-se também a coordenação axial do hemo P, substituindo-se a histidina 74 por uma metionina tendo-se verificando-se que esta mutação não altera a função de cada hemo. O hemo E continuou a ser responsável pelo sinal de spin-alto, no entanto a enzima mutante permaneceu inactiva [65]. Ao alterar a coordenação do hemo E para bis-histidina, a PCc mutante M278H de *Rb. capsulatus* no estado de valência mista não exibiu bandas de spin-alto a 380 nm e a 630 nm, sugerindo que a coordenação da metionina do hemo E é muito importante para a alteração de spin do hemo P [65].

De realçar que as PCc de *Ni. europaea* e a *Mc. capsulatus* são as únicas que não apresentam este mecanismo de activação uma vez que catalisam no estado oxidado, sendo proposto que tenham um mecanismo enzimático semelhante ao encontrado para as PCc de eucariótidas [53, 60-62 e 69].

1.2.11 Inactivação de peroxidases pelo peróxido de hidrogénio

Alguns estudos *in vitro* mostraram que, tal como o citocromo *c* de cavalo [155, 156], também as peroxidases podem ser inactivadas pelo peróxido de hidrogénio quando este se encontra em grande concentração [157]. O estudo do processo de inactivação de várias peroxidases permitiu propor um mecanismo de inactivação comum a todas [157]. Na presença

de elevadas concentrações de peróxido de hidrogénio, este composto desempenha o papel de substrato suicida, convertendo o ião oxiferril (composto IV, Figura 1.15), num radical peroxi-ferro (III) porfirina (composto VI, Figura 1.15).

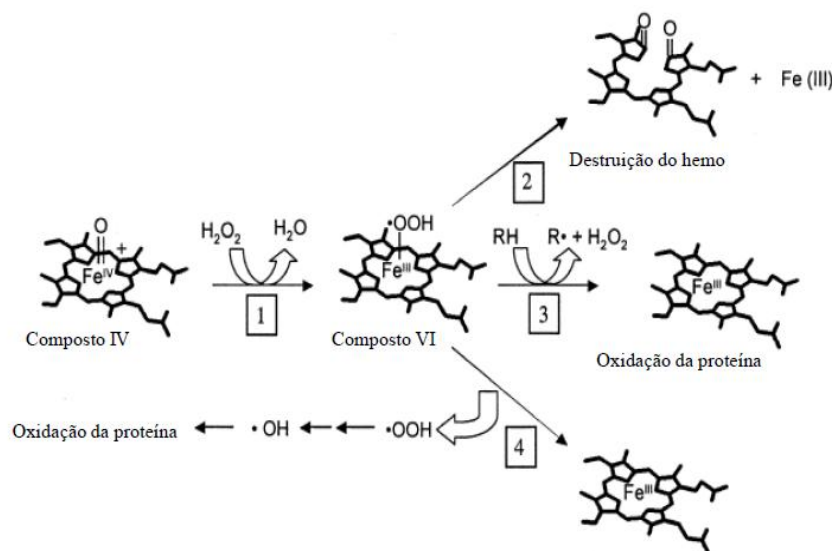


Figura 1.15 Mecanismos de inativação de PCc, proposto a partir do composto IV. Reacção (1): conversão do composto IV no composto VI, na presença de excesso de peróxido de hidrogénio. São possíveis três caminhos de decomposição do composto VI: (2) reacção com o tetrapirrol, oxidando a porfirina e libertando o ião ferro; (3) regresso ao estado inicial (composto V, Figura 1.14); (4) o peróxido de hidrogénio é o doador de electrões, originando um radical peróxido e a regeneração do hemo ao estado inicial (composto V, Figura 1.14). Retirado da referência 157.

Durante a inativação das peroxidases ocorre a formação da espécie reactiva de oxigénio com maior poder destruidor, o radical peróxido (Figura 1.15, caminho (4)).

Dequaire e colaboradores verificaram que a inativação de peroxidases pelo peróxido de hidrogénio também ocorre durante a catálise mediada, mesmo em presença de excesso de mediador [158], tendo proposto a formação de espécies intermediárias e a regeneração da enzima (Figura 1.16).

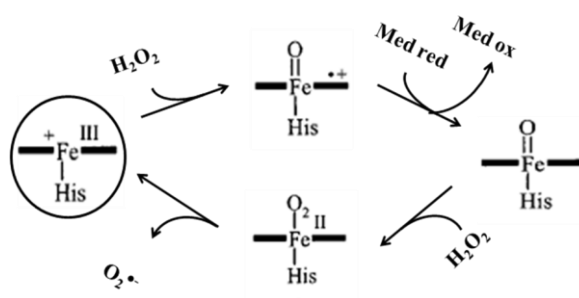


Figura 1.16 Esquema do mecanismo de inativação de peroxidases, onde se apresenta a regeneração do mediador e a formação de espécies intermediárias durante a catálise do peróxido de hidrogénio mediada por peroxidases. O hemo catalítico, circundado, no final do processo de inativação é novamente regenerado. Esquema adaptado da referência 158.

Durante o processo de inactivação, ocorre não só a regeneração do hemo catalítico e do mediador mas também a formação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que poderão ser precursores do peróxido de hidrogénio.

A inactivação pelo peróxido de hidrogénio foi reportada para a catálise da PCc bacteriana de *Pa. pantotrophus* mediada pela pseudoazurina [159].

1.3 Complexos de transferência electrónica - peroxidases do citocromo *c* e citocromos *c*

As PCc bacterianas e os seus parceiros fisiológicos formam complexos durante o processo de redução do peróxido de hidrogénio a água. No ciclo catalítico a enzima PCc requer dois electrões para completar a redução do peróxido de hidrogénio a água. Estes electrões são normalmente fornecidos por pequenas proteínas transportadoras de electrões - os seus parceiros fisiológicos [160]. No caso das PCc, os seus parceiros são normalmente citocromos *c* pertencentes ao mesmo organismo [42, 47, 58, 60, 67 e 70], mas também podem ser cupredoxinas (proteínas contendo centro de cobre tipo 1), como a pseudoazurina [51, 52 e 159] ou a azurina [97, 161].

As reacções de transferência de electrões entre proteínas num complexo implicam, normalmente o rearranjo das proteínas e o acoplamento electrónico entre ambas para que a transferência ocorra com a máxima eficácia [178- 184]. As interacções envolvidas na formação de complexos podem ser de natureza electrostática ou hidrofóbica, dependem do tamanho e das características das superfícies proteicas de contacto, bem como da (des)solvatação, pontes salinas ou ligações por pontes de hidrogénio que se estabelecem entre as interfaces dos parceiros [185- 187]. A formação de complexos pressupõe que as proteínas tenham afinidades e especificidades entre si o que permitirá que as mesmas reconheçam os seus parceiros fisiológicos [185- 190].

O mecanismo de formação de complexos prevê que proteínas livres sintam a presença de outras ao entrar no seu campo electrostático, se aproximem e formem um complexo transiente. Este pode dissociar-se ou as proteínas podem deslizar sobre as superfícies uma da outra, de forma a que as suas superfícies se encaixem e os seus centros de transferência fiquem posicionados permitindo uma transferência eficaz de electrões. Se o complexo é transiente, após a transferência de electrões dissocia-se, sendo esta fase favorecida pela alteração da densidade electrónica em torno dos centros de transferência de electrões, que provavelmente introduzirá alterações conformacionais e de afinidade. Esta alteração do estado redox permite às proteínas ligarem-se somente quando ambas estão preparadas para a transferência de electrões [188- 193].

1.3.1 O citocromo c_{552} de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

O doador fisiológico de electrões da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é o citocromo c_{552} [70]. Este citocromo tipo-*c* sendo o mais abundante no periplasma de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, foi um dos primeiros citocromos desta bactéria a ser isolado e caracterizado [162].

O citocromo c_{552} é um dímero cujo monómero é constituído por 86 aminoácidos e tem uma massa molecular de 9,5 kDa (valor determinado por espectroscopia de massa). O monómero apresenta um ponto isoelectrico de 7, uma carga global de +4 (pH 7,0) e um momento dipolar de 215 Debye [163, 164]. (Figura 1.17).

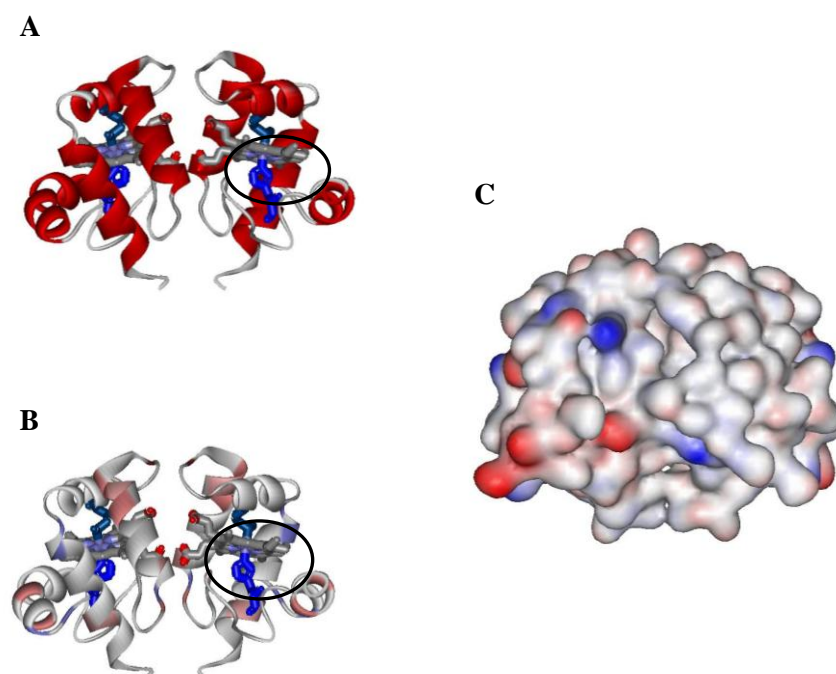


Figura 1.17 Estrutura do dímero do citocromo c_{552} obtida a pH 5,6 (código PDB: CNO) tendo em conta a (A) estrutura secundária, (B) os pKa dos resíduos e (C) os resíduos carregados da superfície. Em (C) a coloração azul representa as partes básicas carregadas positivamente na superfície da proteína e a vermelha representa as partes ácidas negativamente carregadas da superfície da proteína. Os hemos estão coloridos a cinzento e a azul os ligando hémicos (His 18 e Met 60). Na estrutura A e B circundou-se a zona do hemo exposta ao solvente. Figura preparada com Accelrys Viewerlite.

O monómero é constituído por quatro hélices- α que envolvem o hemo, mas deixam uma parte deste grupo exposto ao solvente (Figura 1.17-B). O hemo está covalentemente ligado à cadeia polipeptídica, através da ligação tio-éter das cisteínas 14 e 17 estando o átomo de ferro coordenado axialmente pelas cadeias laterais da histidina 18 e da metionina 60 [163].

Verificou-se que em solução, tal como no cristal, este citocromo está na forma de dímero, não sendo esta estrutura quaternária alterada pela variação de pH, força iónica (entre 150 e 300 mM de NaCl) ou estado redox do hemo (citocromo na forma oxidada ou reduzida) [163].

A interface do dímero do citocromo c_{552} corresponde a 19 % da área de superfície total do monómero do citocromo [163]. No dímero, os dois hemos interagem *via* cadeias laterais de um dos grupos propionato, sendo a distância entre os átomos de ferros de 18,9 Å [163]. Entre as cadeias de aminoácidos dos dois monómeros estabelecem-se várias ligações por pontes de hidrogénio e interações polares, o que confere grande estabilidade ao dímero em solução. A sua superfície maioritariamente apolar [162, 163] proporciona interações com diferentes parceiros redox, uma vez que as interações hidrofóbicas são menos específicas e menos direccionais que as electrostáticas [70, 165 e 166].]

O citocromo c_{552} apresenta, na forma totalmente oxidada, a pH 7,5, um máximo de absorção ao comprimento de onda 412 nm (γ -Soret), uma banda a 527 nm e outra a 680 nm (esta última indicativa da metionina como ligando axial do ferro hémico) e uma conformação de spin-baixo [163, 167]. Na forma reduzida, a pH 7,5, o espectro apresenta máximos de absorção aos comprimentos de onda 417 nm (banda γ -Soret), 522 nm (banda β) e a 552 nm (banda α) [162]. O espectro de ^1H -RMN, da forma oxidada, deste citocromo apresenta características de um citocromo de spin-baixo, com ressonâncias entre 35,0 ppm e -16,0 ppm [167]. As ressonâncias a campo baixo, entre 35,0 e 13,41 ppm, correspondem aos prótons dos grupos metilo do hemo. A ressonância a campo alto -15,3 ppm corresponde ao grupo CH_3 da metionina axial [167 e 168].

O potencial formal de redução do citocromo c_{552} foi determinado por potenciometria [165] e por voltametria cíclica [164, 169], tendo-se estimado um valor de + 250 mV *vs* ENH a pH 7,6 por ambas as técnicas. Em estudos da variação do sinal electroquímico do citocromo com o pH determinou-se a constante de ionização $\text{p}K_a$, que foi estimada como sendo 9,0 e atribuída à saída do ligando metionina do ferro hémico [168, 169]. A pH superior a 10 ocorre a desprotonação da histidina e a pH 11 ocorre a desnaturação, observando-se um alargamento das ressonâncias atribuídas aos prótons hémicos e a ausência de alguns picos nos espectros de ^1H -RMN [165, 168].

1.3.2 O citocromo *c* de cavalo

O citocromo *c* de coração cavalo tem sido extensivamente caracterizado bioquímica, espectroscópica e electroquimicamente [164, 169- 173]. A sua estrutura tridimensional, determinada por cristalografia de raios-X é apresentada na Figura 1.18 [171].

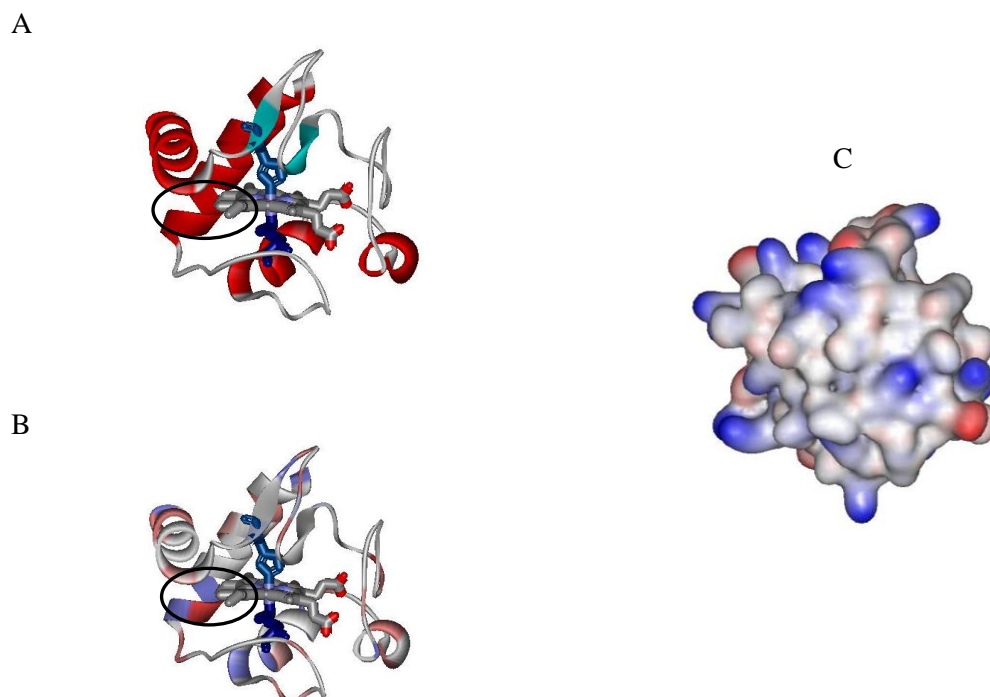


Figura 1.18 Estrutura do dímero do citocromo *c* de cavalo (código PDB: 1HRC) tendo em conta a (A) estrutura secundária, (B) os pK_a dos resíduos e (C) os resíduos carregados da superfície. Em (C) a coloração azul representa as partes básicas carregadas positivamente na superfície da proteína e a vermelha representa as partes ácidas negativamente carregadas da superfície da proteína. Os hemos estão coloridos a cinzento e azul os ligando hémicos (His 18 e Met 80). Na estrutura circunda-se a zona do hemo exposta ao solvente. Figura preparada com Accelerlys Viewerlite.

O citocromo *c* de cavalo é um monómero com forma esférica, cujo hemo está covalentemente ligado à cadeia polipeptídica através de duas ligações tio-éter às cisteínas 14 e 17. O ferro hémico tem como ligandos axiais a histidina 18 e a metionina 80. Este citocromo apresenta uma superfície positivamente carregada a pH neutro, uma massa molecular de 12,4 kDa, um ponto isoelétrico de 10,5 [164], uma carga global de +9 a pH 7,0 [164, 169 e 171] e um momento dipolar de 324 Debye [164].

Este citocromo de spin-baixo, na forma totalmente oxidada, apresenta um máximo de absorção ao comprimento de onda 405 nm (γ -Soret), uma banda α a 540 nm e uma banda a 680 nm (esta última indicativa da metionina como ligando axial do ferro hémico). Na forma reduzida, o espectro apresenta máximos de absorção aos comprimentos de onda 417 nm (banda γ -Soret), 522 nm (banda β) e 550 nm (banda α).

A principal função do citocromo *c* é transportar electrões dentro da cadeia transportadora de electrões [172]. O seu potencial redox é +260 mV *vs* ENH (pH 7,0) [164, 171] variando com a temperatura [171, 173 e 174], a pressão [173, 174], a composição do electrólito e a força iónica do mesmo [175, 176].

Em estudos com o citocromo *c* estimou-se uma constante de ionização pK_a de 9,3 que foi atribuída à saída do ligando metionina do hemo, consequência do enfraquecimento da ligação entre o ferro e a metionina devido à desprotonação do ligando histidina proximal [168, 174 e 177].

1.3.3 Complexos formados entre peroxidases do citocromo *c* e os parceiros redox

Recorrendo ao Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) e a diferentes algoritmos é possível simular interações entre proteínas. Os algoritmos mais usados para estudar complexos de transferência de electrões são o HADDOCK e o BiGGER [199- 201]. As simulações de atracamento molecular, cujo objectivo é obter um modelo teórico estrutural plausível, baseado em parâmetros obtidos experimentalmente, permitem obter uma gama de orientações possíveis para os complexos [199- 204]. Dados de espectroscopia de UV-visível [197, 198], de ^1H -RMN [197, 205 e 206], de cristalografia de Raios - X [206- 208] e de estudos mutagénicos [65, 67] têm sido utilizados na análise das soluções de atracamento molecular dos complexos entre as peroxidases e os seus parceiros fisiológicos. Alguns complexos têm sido estudados por esta metodologia, como é o caso dos complexos de PCc de *Pa. pantotrophus* com o citocromo *c* de cavalo [197], com o citocromo c_{550} [52, 205] e com a pseudoazurina do mesmo organismo [51]. Também o complexo entre a reductase do óxido nitroso e o citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foram estudados por atracamento molecular, tendo-se identificado em todos estes estudos possíveis posições de atracamento entre os dois [166, 209].

Geralmente os potenciais formais do hemo de transferência electrónica são próximos dos potenciais redox dos seus parceiros fisiológicos [97], o que facilita a transferência de electrões quando estes formam o complexo. O hemo de transferência electrónica (E) da PCc de *Pa. pantotrophus* tem um potencial formal de +226 mV, que é próximo do potencial de redução dos seus parceiros fisiológicos, o citocromo c_{550} (+265 mV) e da pseudoazurina (+250 mV) [97]. Os parceiros fisiológicos podem não ser únicos, como é o caso anteriormente referido da PCc de *Pa. pantotrophus* [51, 52 e 197]. De facto, o mesmo citocromo pode interagir com diferentes enzimas, como é o caso do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, que doa electrões à reductase do nitrito (citocromo cd_1 ou NiR) [163, 167], à reductase do óxido nitroso (N_2OR) [166, 209] e à PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* [70].

A interacção entre o citocromo c_{552} e a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi analisada a pH 7,5 usando espectroscopia do visível e os resultados indicam que a interacção entre estas proteínas é de natureza hidrofóbica [70]. Foi proposto nesse estudo que o dímero do citocromo c_{552} se orienta na superfície da PCc, guiado pelo carácter apolar da sua superfície, o que permite uma optimização da transferência electrónica [70, 71]. No complexo entre o citocromo c_{552} e a N_2OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a interacção entre ambos é também

maioritariamente hidrofóbica, verificando-se por estudos de atracamento molecular que a superfície da N₂OR envolvida na transferência de electrões tem 64-86% de resíduos apolares [166]. Foi possível neste estudo identificar possíveis posições de atracamento entre ambos os parceiros [166].

Em estudos da interacção entre a NiR de *Ps. aeruginosa* e o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi possível verificar que esta é independente da força iónica, sendo o complexo governado por interacções hidrofóbicas [210, 211]. Análises de atracamento molecular entre estas duas proteínas identificaram possíveis locais de interacção entre ambos. Revelaram, ainda, que esta interacção poderá ocorrer *via* propionatos da NiR e o pirrol do hemo do citocromo *c*₅₅₂, sendo a distância entre os ferros hémicos nesta situação de 17 Å [163]. Uma vez que a NiR de *Ps. aeruginosa* apresenta 67% de homologia em relação à NiR de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, extrapolou-se que a interacção e o complexo entre o citocromo *c*₅₅₂ e a NiR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* sejam semelhantes ao anteriormente descrito [163].

A interacção da PCc de *Ps. stutzeri* com o citocromo *c* de cavalo foi estudada, verificando-se que é de natureza electrostática. Este resultado é concordante com o facto do citocromo *c* de cavalo ter um potencial superficial positivo, ligando-se por interacções tipo dipolo-dipolo à PCc, que tem uma carga negativa à superfície [58]. Da análise da interacção entre a PCc de *Ps. stutzeri* e o citocromo *c*₅₅₁ da mesma bactéria, constatou-se que se estabelecem entre ambos interacções de natureza hidrofóbica. Quando a orientação das duas proteínas é a adequada, forma-se um complexo Cc₅₅₁:PCc (1:1) [58].

O complexo entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₀ de *Pa. pantotrophus* foi estudado por métodos espectroscópicos. A baixa força iónica e a pH 6 forma-se um complexo, PCc:Citc₅₅₀ (1:1) com uma constante de ligação estimada de $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, sendo a interacção entre ambos de natureza electrostática. O momento dipolar do citocromo orienta-o em relação à proteína, de modo a otimizar a transferência electrónica entre ambos. A elevada força iónica não há formação do complexo, nem transferência electrónica [47, 205]. A pseudoazurina de *Pa. pantotrophus* foi também identificada como parceiro fisiológico da PCc de *Pa. pantotrophus* [51, 52]. A PCc forma com a pseudoazurina um complexo com a estequiometria 1:1, de carácter electrostático. Simulações computacionais com o algoritmo BiGGER mostraram que o local de ligação da pseudoazurina à PCc é o mesmo do citocromo *c*₅₅₀ [52]. Foi também analisado o complexo entre a PCc de *Pa. pantotrophus* e o citocromo *c* de cavalo, verificando-se que o local de ligação do citocromo *c* é idêntico ao do citocromo *c*₅₅₀, formando-se um complexo cuja estequiometria é 2:1, citocromo *c*: PCc [206]. No entanto, para o citocromo *c* de cavalo foi ainda identificado outro local possível de ligação [206].

O citocromo *c*₅₅₅ de *Mc. capsulatus* foi identificado como parceiro fisiológico da PCc do mesmo organismo [69].

A interacção entre a PCc de *Rb. capsulatus* e seu parceiro fisiológico, o citocromo c_2 , foi estudada. Verificou-se que a mesma tem um carácter electrostático, tendo as pontes salinas, que se formam entre ambos, nas proximidades dos hemo, um papel de orientador do citocromo c_2 em relação ao hemo E da PCc [67].

1.4 Âmbito do trabalho

O projecto de investigação que se encontra na base desta dissertação de doutoramento, teve como objectivos criar conhecimento e investigar o mecanismo de activação e a catálise directa da peroxidase do citocromo c da bactéria marinha Gram-negativa *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bem como estudar a catálise da peroxidase do citocromo c mediada pelo citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*.

No sentido de concretizar os objectivos do projecto de investigação, desenvolveu-se uma pesquisa centrada inicialmente na PCc e depois no complexo entre esta e o seu doador fisiológico, o citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus*.

Utilizando técnicas espectroscópicas foi possível analisar o mecanismo de activação da enzima. As técnicas electroquímicas e espectroscópicas permitiram analisar a influência de condições, como a força iónica e o pH, na catálise mediada da PCc. A utilização de simulações de atracamento molecular possibilitou a análise de possíveis estruturas de complexos transientes entre a peroxidase do citocromo c e o seu parceiro fisiológico e obter um modelo estrutural para o complexo de transferência electrónica.

2.1 Crescimento da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617

2.1.1 O microrganismo

As proteínas estudadas neste trabalho (peroxidase do citocromo *c* e citocromo *c*₅₅₂) foram isoladas de uma cultura pura da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* da colecção do Instituto Pasteur com a referência nº 617/1.85 (estirpe 617), fornecida pelo laboratório CNRS de Marselha. Esta bactéria halofílica foi isolada em 1985 num sedimento marinho no golfo de Fos (Marselha) e depositada no Instituto Pasteur com o nome de *Pseudomonas nautica* e o número 617/1.85 [212- 214]. Após um estudo baseado em análises comparativas entre morfologia, fenótipo e genótipo Spröer e colaboradores reclassificaram esta espécie como *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* [215].

Em 2012 foi publicado o genoma da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 [100]. Este apresenta um único cromossoma com uma percentagem de G+C de 57,43 % e um tamanho de 3989480 bases nucleicas, que codifica para 39 a 42 citocromos com um ou mais grupos hémicos [100].

2.1.2 Preparação do meio de cultura líquido e sólido

O meio de cultura líquido utilizado nos crescimentos de *Ma. hydrocarbonoclasticus* teve a composição indicada na Tabela 2.1 e foi suplementado com as soluções indicadas na Tabela 2.2. A solução de oligoelementos de Starkey [216] usada teve a composição indicada na Tabela 2.3. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico.

Tabela 2.1 Composição do meio de cultura líquido, para o crescimento da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*. O pH do meio foi ajustado a 7,5 e o meio foi esterilizado numa autoclave [70].

Composto	Quantidade por litro
NaCl	11,7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,3 g
KCl	0,75 g
Tris-base	6,05 g
NH ₄ Cl	3,00 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	1,47 g
Extracto de levedura	1,00 g
Na-Lactato 60% (m/m)*	12,5 ml

*Correspondendo a uma concentração final de 0,8 % (m/V)

Tabela 2.2 Soluções adicionadas ao meio de cultura líquido para o crescimento da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Estas soluções foram preparadas e autoclavadas separadamente [70].

Solução	Quantidade por litro
FeSO ₄ .7H ₂ O (1 mg/mL)*	2,0 mL
K ₂ PO ₄ .3H ₂ O (18,6 mg/mL)	4,0 mL
Solução de oligoelementos de Starkey	1,0 mL

*Adicionar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado a esta solução.

Tabela 2.3 Composição da solução de oligoelementos de Starkey [216]. Esta solução foi esterilizada numa autoclave.

Reagente	Quantidade por litro
FeSO ₄ .7H ₂ O	6,20 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,44 g
MgSO ₄ .4H ₂ O	1,12 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,90 g
BO ₃ H ₃	0,06 g
Mo ₇ (NH ₄) ₆ O ₂₄ .4H ₂ O	1,00 g
Ni(NO ₃) ₃ .6H ₂ O	0,04 g
Na ₂ SeO ₃	0,02 g
HCl concentrado (~12M)	51,4 mL

O meio de cultura sólido, preparado por mistura de meio de cultura líquido com solução de agar, teve a mesma composição que o meio de cultura líquido. No entanto, a solução de meio de cultura e a solução de agar foram preparadas separadamente, sendo que o meio de cultura líquido foi preparado com o dobro da concentração tal como a solução de agar, para que a concentração final de agar seja 15 g/L de meio de cultura. Após aquecer o agar a 50.°C, estas duas soluções foram adicionadas uma á outra e colocadas em placas de Petri. As placas foram mantidas a 4.°C (no máximo durante 2 semanas) até serem usadas.

2.1.3 Condições de crescimento

A cultura pura de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi mantida através de crescimentos em meio sólido. Após inoculação, as placas foram incubadas a 30 °C, durante 24 horas. A cultura foi repicada de duas em duas semanas.

A massa celular de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, necessária para o isolamento das proteínas em estudo, foi obtida através de crescimentos num microfermentador de 10 L (Sartorius- (BiostalB plus)). Para tal, foi necessário realizar uma série de pré-inóculos, os quais se iniciaram com a inoculação de 5 mL de meio de cultura num *erlenmeyer* de 50 mL, a partir do crescimento em placa. Este pré-inóculo foi incubado durante 24 horas, sob agitação orbital a 230 rpm à temperatura de 30 °C, e usados para inocular 20 mL de meio de cultura (num *erlenmeyer* de 100 mL), incubados como descrito anteriormente. Deste último crescimento, foram usados 25 mL para inocular 225 mL de meio (num *erlenmeyer* de 1 L), incubados nas condições referidas. Um litro deste inóculo foi usado para inocular 9 L de meio de cultura num microfermentador.

Em cada um destes passos foi feita a leitura da densidade óptica a 600 nm, assim como a verificação da pureza da cultura num microscópio óptico (Olympus BX 51) (Figura 2.1).

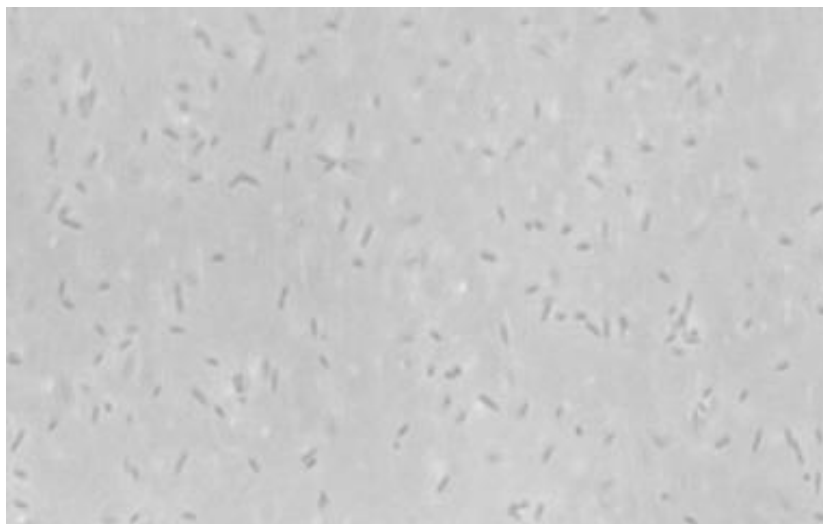


Figura 2.1 Cultura da bactéria Gram-negativa *Ma. hydrocarbonoclasticus* em meio de cultura líquido, recolhido de um microfermentador de 10 L, após 3 horas de incubação. A morfologia típica desta bactéria (bastonetes) pode ser observada nesta imagem obtida com um microscópio óptico (ampliação de 1000 x/1.3 oil Ph3).

No microfermentador, o meio de cultura esterilizado foi suplementado com a solução de oligoelementos anteriormente descrita (Tabela 2.3) e com as soluções de sulfato de ferro e de hidrogenofosfato de potássio, nas proporções indicadas na Tabela 2.2.

Todos os crescimentos foram termostatizados a 30 °C, com um arejamento de 0,2 vvm e o pH do meio foi mantido a 7,5, através da adição automática de ácido clorídrico 1 M (esterilizada por autoclavagem) e hidróxido de sódio 1 M (esterilizada por autoclavagem). A fonte de carbono e energia foi o lactato, numa concentração final de 0,8 % (m/V). Todos os crescimentos no microfermentador tiveram a duração de 42 horas.

As condições testadas nos diferentes crescimentos efectuados no microfermentador, de forma a otimizar a quantidade de peroxidase de citocromo *c* foram: a velocidade de agitação e a quantidade de nitrato de sódio adicionado ao meio de cultura (Tabela 2.4)

Tabela 2.4 Quantidade de nitrato de sódio e velocidade de agitação utilizadas em cada um dos crescimentos realizados no microfermentador.

Crescimento	[NaNO ₃] (μM)	Agitação (rpm)
1	-	150
2	Vestigial	150
3	15	150
4	30	150
5	120	150 → 50

A monitorização da temperatura, pH e oxigénio dissolvido no meio foi realizada com um sensor de temperatura (Radiometer) e eléctrodos específicos, que se encontravam imersos

no meio de cultura e que foram previamente calibrados (Figura 2.2). O eléctrodo de pH (Mettler Toledo) foi calibrado de acordo com o protocolo de calibração de eléctrodos CRISON, utilizando soluções padrão de pH 4,0, 7,0 e 9,0. No caso do eléctrodo de oxigénio (Hamilton), o 100 % de oxigénio dissolvido foi estabelecido após a saturação do meio com ar.

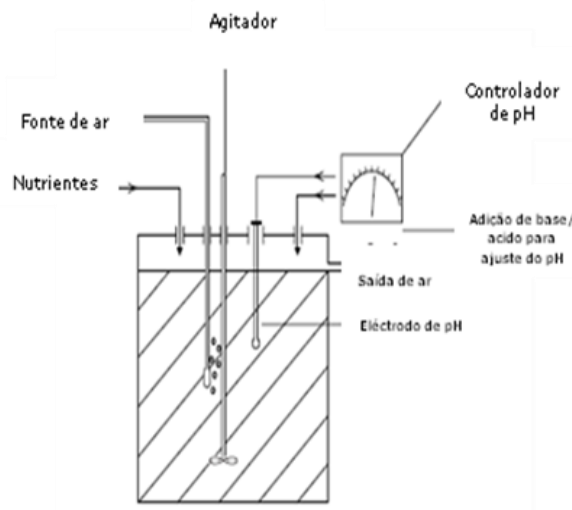


Figura 2.2 Esquema do microfermentador de 10 litros onde se efectuaram os crescimentos da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*.

Na Figura 2.3 apresenta-se a curva de crescimento obtida no crescimento 5 (Tabela 2.4) evidenciando a percentagem de dióxigénio dissolvido ao longo do crescimento.

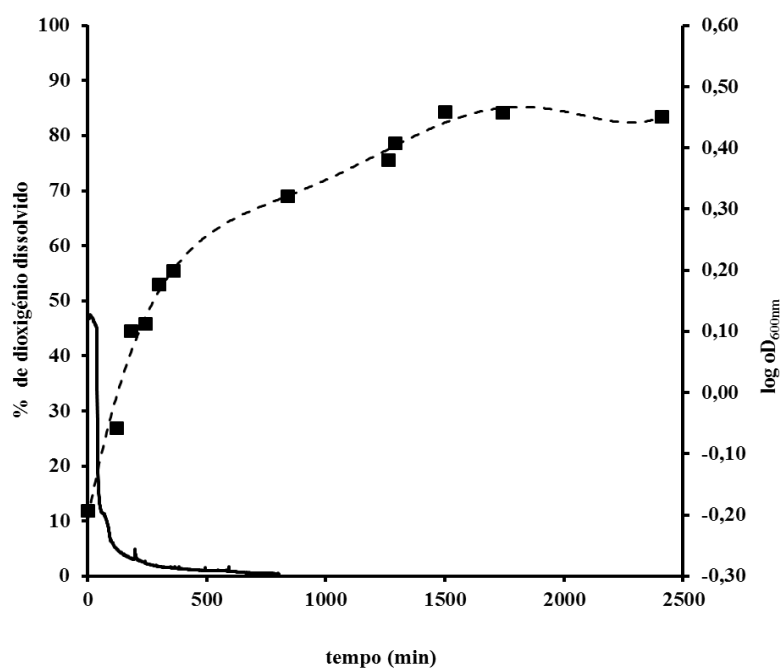


Figura 2.3 Curva de crescimento da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus*, obtida num fermentador de 10 L em que (—) representa a percentagem de oxigénio dissolvido registada ao longo do crescimento e (■) representa o logaritmo da densidade óptica a 600 nm ao longo do tempo. Condições de crescimento: lactato 0,8 % (m/V), NaNO₃ 120 μM, pH 7,5, velocidade de arejamento 0,2 vvm. A velocidade de agitação foi de 150 rpm durante as primeiras 3 horas, sendo depois reduzida para 50 rpm, o crescimento foi realizado a 30 °C, durante 42 horas.

Após 42 horas as células foram recolhidas por centrifugação a 14000 g ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) (1 mL/g de massa celular húmida) e mantidas a -80 °C até serem usadas. A massa de células resuspendidas variou entre 96 e 111 g nos vários crescimentos (Capítulo 3|).

2.2 Purificação das proteínas de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

2.2.1 Preparação de esferoplastos

A *Ma. hydrocarbonoclasticus* é uma bactéria Gram-negativa pelo que apresenta um espaço periplasmático onde se encontra a peroxidase do citocromo *c* e o citocromo *c*₅₅₂. Assim procedeu-se do seguinte modo para obter a fracção periplasmática: a suspensão de células descongeladas (aproximadamente 200 mL) foi diluída cinco vezes em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), contendo inibidor de proteases (*Complete*, EDTA-free, Roche diagnostics) (uma pastilha por litro de solução) e EDTA (sal di-sódico, 0,5 mM), e manteve-se sob agitação durante 30 minutos. Esta suspensão de células foi ultracentrifugada durante 45 minutos a 125000 g (Beckman L-70 Ultracentrifuga). A incubação com a solução de EDTA não deverá ser superior a 30 minutos, uma vez que se verificou, através de SDS-PAGE do periplasma que a incubação prolongada aumenta a contaminação do periplasma com o conteúdo citoplasmático (resultado não apresentado).

2.2.2 Purificação da peroxidase do citocromo *c*

A PCc foi purificada em 38 horas, de forma a minimizar a sua proteólise. Todos os tampões usados na purificação foram suplementados com inibidor de protéase (uma pastilha de “Complete” por litro de solução tampão). As fracções intermédias foram mantidas em gelo durante a purificação e a fracção pura foi congelada em azoto líquido e mantida a - 80 °C em pequenas alíquotas (200 µL). O procedimento usado na purificação está apresentado na Figura 2.4.

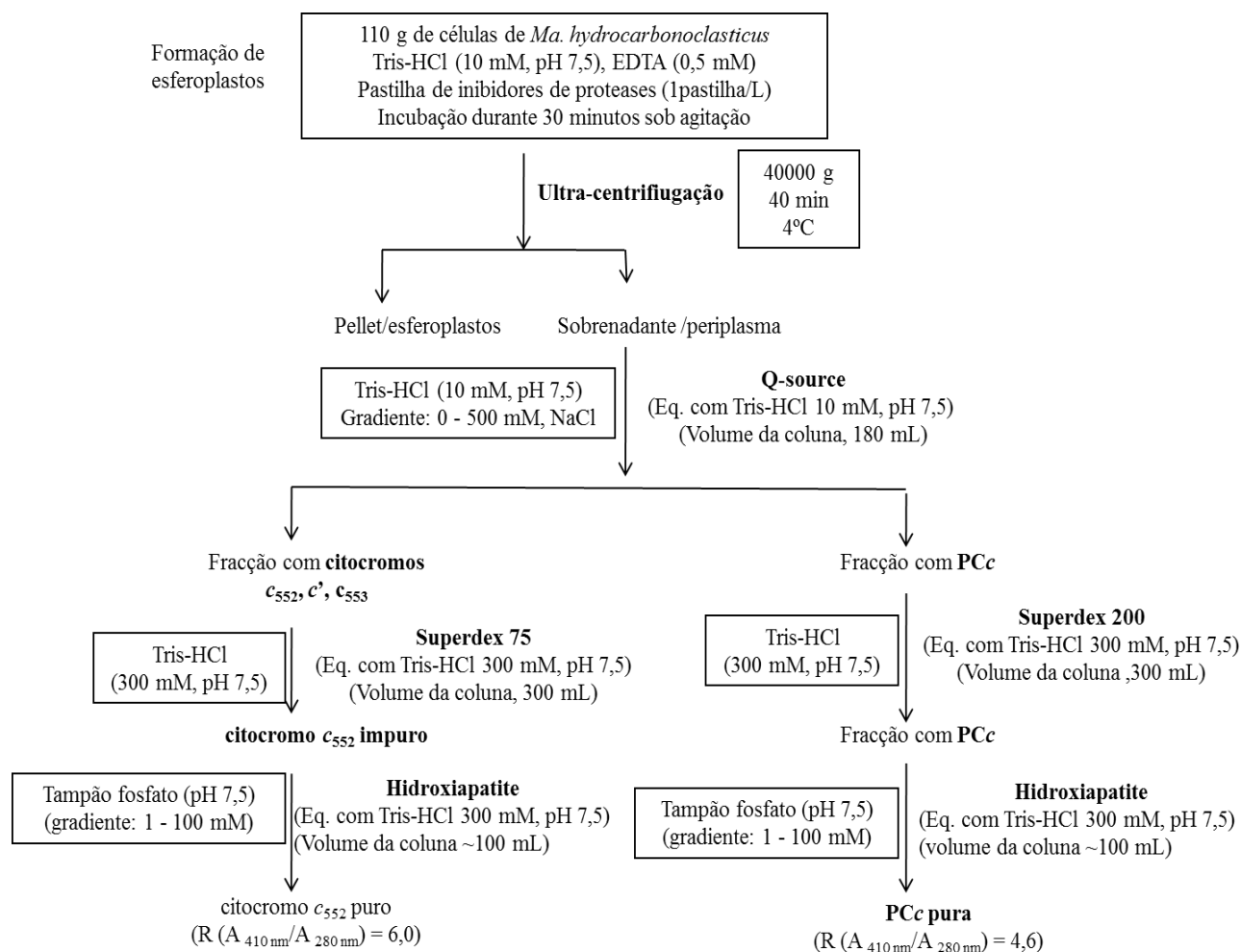


Figura 2.4 Esquema geral da purificação da peroxidase do citocromo *c* e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Os tampões indicados referem-se aos tampões de eluição dos diversos passos cromatográficos.

O extracto periplásmico resultante da centrifugação foi submetido a três passos cromatográficos: inicialmente utilizou-se uma cromatografia de troca aniónica, uma coluna Source-Q (GE Healthcare, com um volume de coluna de 180 mL), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,5), a um caudal de 2 mL/min. Após a aplicação da amostra eluíram-se as proteínas não adsorvidas à resina (onde se incluem o citocromo *c*₅₅₂, o citocromo *c*₅₅₃ e o citocromo *c*[']) com tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,5). As restantes proteínas foram eluídas com um gradiente linear de força iónica entre 0 e 500 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), durante 12 horas. A PCc foi eluída a aproximadamente 250 mM de NaCl. A fracção de PCc foi concentrada sobre uma membrana de 10 kDa (Vivaspin).

Esta fracção foi aplicada numa coluna de exclusão molecular (Superdex 200, GE Healthcare, com um volume de coluna de 360 mL), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl (300 mM, pH 7,5) e eluída com o mesmo tampão a um caudal de 2 mL/min.

A melhor fracção resultante deste segundo passo cromatográfico foi aplicada numa coluna de hidroxiapatite (Bio-Rad, com um volume de coluna de 60 mL), previamente

equilibrada com tampão Tris-HCl (300 mM, pH 7,5). A eluição foi feita por aplicação de um gradiente linear de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) entre 1 mM e 100 mM, a um fluxo de 1 mL/min. A enzima foi eluída a aproximadamente 35 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,5).

As melhores fracções de cada coluna foram seleccionadas tendo em conta o grau de pureza das mesmas, o qual foi determinado pela razão entre a absorvância a 408 nm e a absorvância a 280 nm.

Após a purificação, as amostras de PCc foram analisadas por electroforese em gel poli-acrilamida a 12,5% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), para verificar o seu grau de pureza e se a proteína não sofreu proteólise. A razão de pureza ($A_{410\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) máxima foi de 4,6 não estando as amostras proteolisadas.

A fracção de PCc pura foi concentrada sob membrana de membrana de 10 kDa (Vivaspin), congelada em azoto líquido e mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em pequenas alíquotas (200 μL).

2.2.3 Purificação do citocromo c_{552} de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

A fracção contendo os citocromos e que não adsorveu à matriz Source-Q foi concentrada sob membrana de 3 kDa (Vivaspin) e aplicada numa cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75, GE Healthcare, com um volume de coluna de 300 mL) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl (300 mM, pH 7,5). A eluição fez-se com tampão Tris-HCl (300 mM, pH 7,5) a um caudal constante de 2 mL/min. Desta coluna obtiveram-se duas fracções distintas, a primeira correspondente ao citocromo c' e a segunda ao citocromo c_{552} . Verificou-se que o citocromo c_{552} é o citocromo que se encontra em maior quantidade.

A fracção contendo citocromo c_{552} foi aplicada numa coluna hidroxilapatite (Bio-Rad, volume de coluna de 60 mL) equilibrada com tampão Tris-HCl (300 mM, pH 7,5). Efectuou-se a eluição por aplicação de um gradiente linear crescente de tampão fosfato (pH 7,5) entre 1 mM e 100 mM, a um caudal de 1 mL/min. O citocromo c_{552} foi eluído a aproximadamente 10 mM de tampão fosfato. No final deste último passo cromatográfico, a fracção de citocromo c_{552} puro apresentava uma razão de pureza ($R = A_{410\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) de 6,0.

A fracção de citocromo c_{552} pura foi concentrada sob membrana de 3 kDa (Vivaspin), congelada em azoto líquido e mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em pequenas alíquotas (200 μL).

2.3 Electroforese em gel de poli-acrilamida desnaturante

Esta técnica foi executada de acordo com o método de Laemmli modificado [217, 218]. Os géis foram corados de duas formas diferentes: com azul de Coomassie R-250, para detectar as proteínas presentes nas amostras, e com coloração para hemo (método modificado por Goodhew e colaboradores [218]), para detectar citocromos de tipo c .

2.4 Determinação da concentração das proteínas

A concentração das soluções de proteína foi determinada espectrofotometricamente em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), utilizando a lei de Beer-Lambert e os seguintes coeficientes de extinção molar:

- $\epsilon = 260 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda de Soret (408 nm) da peroxidase do citocromo *c*, na forma oxidada [70];
- $\epsilon = 19,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda α (552 nm) do citocromo c_{552} , na forma reduzida [164, 165];
- $\epsilon = 29,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda α (550 nm) do citocromo *c* de coração de cavalo na forma reduzida [70, 164].

2.5 Determinação da massa molecular aparente por cromatografia de exclusão molecular

Para determinar a massa molecular aparente da peroxidase do citocromo *c* e do citocromo c_{552} , foi usada uma cromatografia de exclusão molecular. A coluna Superdex-200 (GE Healthcare, 1 cm x 30 cm) foi equilibrada com o tampão de eluição pretendido e operada a um caudal de 0,5 mL/min. Para calibrar a coluna usaram-se as seguintes proteínas padrão (GE Healthcare): ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), anidrase carbónica (29 kDa), ribonuclease (14,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa), preparadas no tampão de eluição (tampão 10 mM (pH 7,5) com ou sem NaCl).

A massa molecular aparente das amostras foi calculada a partir da representação do volume de eluição das proteínas padrão em função do logaritmo da massa molecular aparente das mesmas (Figura 2.5).

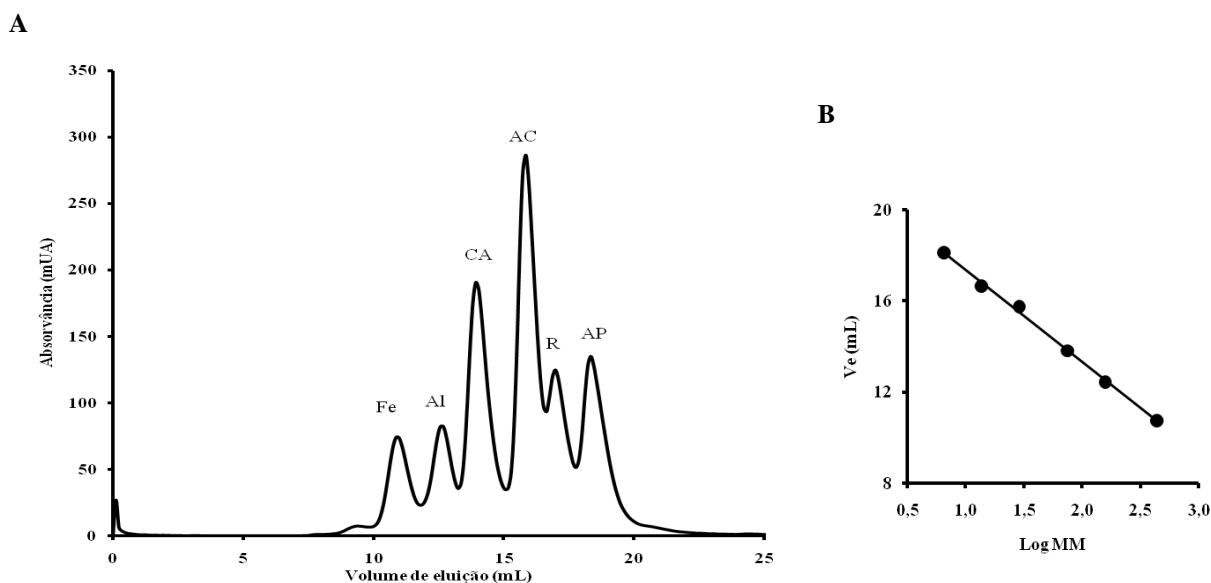


Figura 2.5 (A) Perfil de eluição das proteínas padrão a 280 nm eluídas com Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM e CaCl_2 2 mM, numa coluna de exclusão molecular Superdex-200. Os padrões usados foram: ferritina (Fe), aldolase (Al), conalbumina (CA), anidrase carbónica (AC), ribonuclease (R) e aprotinina (AP). (B) Curva de calibração obtida a partir do perfil de eluição de (A); linearização do volume de eluição (V_e) em função da massa molecular aparente (MM), $V_e = -4,0 \text{ LogMM} + 21,4$ ($r = 0,99$).

2.5.1 Estudo da influência da concentração de PCc na sua massa molecular aparente

A massa molecular aparente da PCc foi determinada para diferentes concentrações iniciais. A aplicação de 100 μ L de duas soluções contendo PCc numa concentração final de 11,2 μ M e 22,5 μ M (em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,0) com NaCl 150 mM) foi efectuada após a passagem das proteínas padrão na coluna cromatográfica.

As proteínas padrão foram preparadas em tampão de eluição.

2.5.2 Estudo da influência dos iões cálcio na massa molecular aparente de PCc

O efeito de iões cálcio na massa molecular aparente de PCc foi estudado a força iónica constante em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,0) com NaCl (150 mM), adicionando-se ou não solução de CaCl_2 (2 mM) ao tampão de eluição e às amostras. Neste estudo, previamente à eluição de 100 μ L de PCc (numa concentração final de 11,2 μ M), eluíram-se as proteínas padrão preparadas no tampão de eluição.

2.5.3 Estudo do efeito da força iónica na massa molecular aparente de PCc

O efeito da força iónica foi estudado eluindo amostras de PCc (11,2 μ M) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) com concentrações diferentes de NaCl (0 mM, 150 mM, 300 mM e 800 mM). As amostras e as proteínas padrão foram preparadas com a mesma força iónica que o tampão de eluição. Para cada uma destas condições efectuou-se uma curva de calibração.

2.6 Caracterização espectroscópica

2.6.1 Espectroscopia de UV- visível

Os espectros de absorção foram adquiridos num espectrofotómetro Shimadzu UV-265 de feixe duplo.

A solução de ascorbato de sódio 100 mM, a solução stock de CaCl_2 (100 mM) e os tampões foram preparadas com água desionizada (Millipore Q). A solução de ascorbato de sódio foi sempre preparada imediatamente antes de cada ensaio.

2.6.1.1 Estudo da activação da PCc

As amostras de PCc (com uma concentração $\sim 4 \mu$ M) foram preparadas em diferentes tampões de concentração 10 mM. Foram utilizados os seguintes tampões para o estudo da activação a diferentes valores de pH: tampão acetato (pH entre 4,5 e 5,0), tampão MES (pH entre 5,5 e 6,5), tampão HEPES (pH entre 7,0 e 8,0) e tampão Tris-HCl (pH 8,5).

A forma de valência mista da PCc foi obtida por adição de ascorbato de sódio e diaminodurol (DAD), numa concentração final de 1 mM e 5 μ M, respectivamente. A redução foi seguida ao longo de 20 minutos, através do registo de espectros UV-visível entre 250 nm e 900 nm. Em seguida adicionou-se CaCl_2 (numa concentração final de 1 mM), tendo-se seguido as alterações nos espectros de UV-visível e registado os mesmos ao longo dos 40 minutos subsequentes. A redução completa da enzima foi obtida por adição de ditionito de sódio numa concentração final de 1 mM (solução preparada no tampão, HEPES 100 mM (pH 7,5), tendo-se registado os espectros.

2.6.1.2 Catálise em estado estacionário mediada pelo citocromo c_{552} - ensaio espectrofotométrico

i) Preparação das proteínas

O citocromo c_{552} 147 μ M, em tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) foi reduzido com ascorbato de sódio (concentração final de 10 mM) durante 40 minutos e o excesso de agente redutor foi removido através de uma cromatografia de exclusão molecular, numa coluna PD10 Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), equilibrada com tampão HEPES 10 mM (pH 7,5).

A amostra de PCc ($\sim 4 \mu$ M) foi activada, em tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) por incubação durante 30 minutos com ascorbato de sódio, DAD e CaCl_2 numa concentração final de 1 mM, 2 μ M e 2 mM, respectivamente. A solução de peróxido de hidrogénio foi preparada com água desionizada (Millipore Q) antes de cada ensaio, numa concentração de 100 mM.

ii) Ensaio de actividade

O ensaio de actividade catalítica da PCc foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Gilmour [47, 48]. Numa célula de quartzo de 1 mL, termostaticada (295 K) e sob agitação magnética, monitorizou-se a absorvância da banda α do citocromo c reduzido (a 552 nm, no caso do citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e a 550 nm para o citocromo c de coração de cavalo (grau de pureza pró análise, da Sigma)). Nestes ensaios usou-se um espectrofotómetro Diodo Array - Agilent 8453 ligado a um computador com o programa de aquisição de dados Agilent Technologies 95-03 (UV-visible Chem-station software). Todas as medições foram realizadas pelo menos três vezes para cada, sendo que em alguns casos foram realizadas quatro.

Nos ensaios de actividade em que se variou a concentração de PCc, utilizou-se tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), CaCl_2 (1 mM) e o citocromo c reduzido (7 μ M) como doador de electrões. A enzima foi activada a pH 7,5 (em concentrações que variaram entre 7 nM e 100 nM) e foi adicionada à mistura anterior, quando esta já se encontrava sob agitação e

monitorização a 552 nm ou a 550 nm. A reacção foi iniciada pela adição do peróxido de hidrogénio (para uma concentração final de 100 μM). Após 70 - 75 s do início do ensaio adicionou-se uma pequena quantidade de hexacianoferrato (III) de potássio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, sólido para oxidar o citocromo *c*.

Nos ensaios para determinar a variação da actividade com o pH, a solução (1 mL) continha citocromo c_{552} reduzido 7 μM , CaCl_2 1 mM e tampão 10 mM, que variou consoante o pH pretendido. A PCc (concentração final de 20 nM) foi activada como se descreveu anteriormente. O procedimento de execução e monitorização do ensaio foi o descrito anteriormente. Os pontos experimentais foram ajustados à equação 2.1,

$$\text{Act. cat.} = \text{Act cat.}_{\text{máxima}} / (1 + 10^{\text{p}K_{a1} - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a2}}) \quad (\text{Eq.2.1})$$

No estudo da variação da actividade catalítica com a força iónica, para além do citocromo *c* reduzido (7 μM), CaCl_2 (1 mM) e tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) adicionou-se cloreto de sódio (entre 0 e 700 mM). Monitorização a absorvância a 552 nm ou a 550 nm, adicionou-se a enzima activada de acordo com o procedimento descrito anteriormente (concentração final de 20 nM) e após 30 s foi adicionado peróxido de hidrogénio (numa concentração final de 100 μM).

Na Figura 2.6 apresenta-se um traço cinético, em que se utilizou o citocromo c_{552} como doador de electrões.

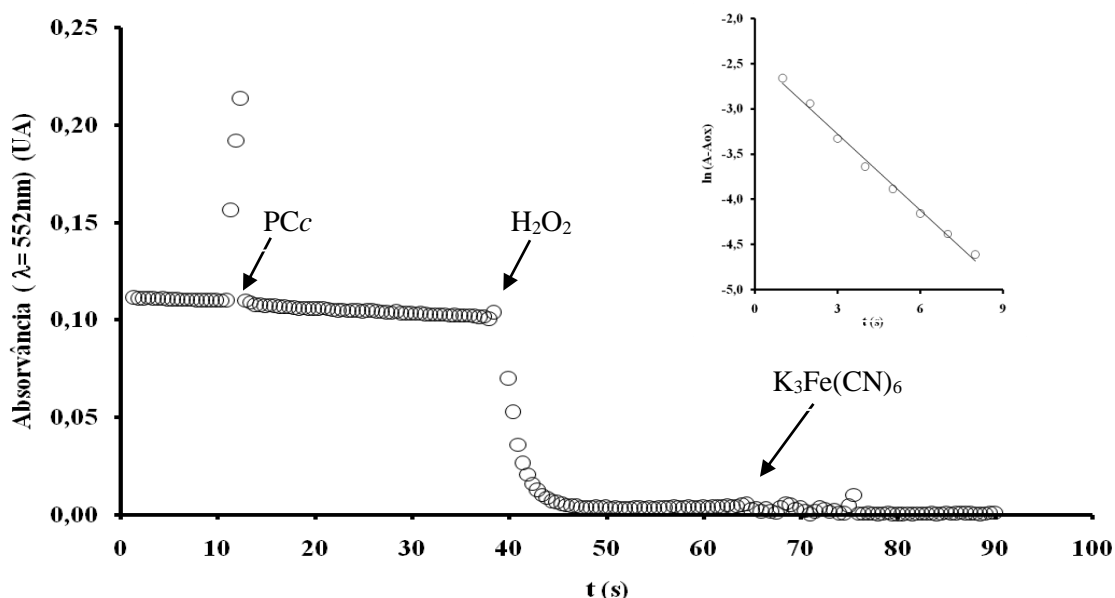


Figura 2.6 Absorvância a 552 nm em função do tempo, registada durante um ensaio de actividade da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*. As setas indicam o momento da adição de PCc, peróxido de hidrogénio e ferricianeto de potássio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, à mistura reaccional. Inserção: linearização do logaritmo neperiano (\ln) da diferença entre a absorvância a 552 nm (A) e a absorvância da mistura reaccional totalmente oxidada (A_{ox}), em função do tempo. A actividade do centro catalítico (k) é determinada pelo produto do declive da recta (k') pela concentração de citocromo *c* e de PCc. Equação da recta ($\ln(A - A_{ox}) = -2,44 - 0,28 t$, $r = 0,99$). Condições experimentais: citocromo c_{552} 7 μM , peroxidase do citocromo *c* 24 nM, CaCl_2 1 mM, tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) e peróxido de hidrogénio (100 μM).

Tendo em conta que a reacção segue uma cinética de pseudo-primeira ordem, a velocidade inicial (v_0) pode ser calculada pela determinação da constante de velocidade (k), em que a velocidade inicial é dada pela equação 2.2 quando a concentração do substrato, H_2O_2 , é saturante:

$$v_0 = k' [\text{Citocromo } c] \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$$\text{em que } k' = k [\text{PCc}] \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Para a determinação da constante de velocidade (k), determinou-se o declive do logaritmo neperiano da diferença entre a absorvância do citocromo a 552 nm e a absorvância do citocromo totalmente oxidado, em função do tempo (Figura 2.6 - inserção). Usaram-se apenas os pontos referentes aos tempos iniciais de reacção após a adição de peróxido de hidrogénio, uma vez que só estes apresentavam uma variação linear [67]. O declive (k') foi multiplicado pela concentração do citocromo c utilizado em cada ensaio e dividido pela concentração de PCc, de modo a calcular a actividade por centro catalítico (Equação 2.2 e 2.3) [63, 67].

2.6.2 Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (RPE)

Nos estudos espectroscópicos por RPE utilizaram-se soluções de PCc com uma concentração de 200 μM em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,5). A amostra de PCc em valência mista foi obtida após a incubação, durante 30 minutos, com ascorbato de sódio (concentração final na amostra 1 mM) e DAD (concentração final na amostra 10 μM). As amostras com cálcio foram preparadas por adição de CaCl_2 (2 mM) a uma solução de PCc de valência mista, seguida de incubação durante 30 minutos. Após este período, a amostra foi congelada por imersão em azoto líquido.

Os espectros de RPE foram adquiridos num espectrómetro (Bruker EMX) a operar na banda X, equipado com crióstato de fluxo contínuo de hélio líquido (ESR 9 - Oxford instruments). Utilizou-se o software WINEPR (Bruker) para a aquisição de dados.

As condições experimentais foram as seguintes: temperatura 8 K, frequência de micro-ondas 9,65 GHz, potência de micro-ondas 3,1 mW, amplitude de modulação 3,1 Gauss, atenuação 25 dB e ganho 1×10^5 .

As simulações dos espectros de RPE foram realizadas com o programa SimFonia (Bruker). Os valores de g usados nas simulações foram obtidos dos espectros de RPE originais usando o programa WINEPR.

2.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN)

i) Preparação da amostra de PCc e aquisição de dados

No estudo da activação da PCc monitorizada por ^1H -RMN usou-se uma solução de 500 μL de PCc com a concentração final de 827 μM , preparada em tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,5) contendo 10% de D_2O . Para obter a concentração de PCc desejada, alíquotas de 200 μM de PCc foram concentradas utilizando uma membrana com um limite de exclusão de 10 kDa (Vivaspin).

Os espectros foram adquiridos entre 100 ppm e -20 ppm num espectrómetro de RMN de 400 MHz (Avance Bruker), por acumulação de 1024 espectros durante 60 minutos, a 298K, usando uma sequência de pulsos em que o sinal da água é eliminado por pré-saturação a 40 dB. Foi utilizada uma sonda (5 mm) PABBO BB - 1Hz / DZ - GRD Z108618 / 0259. Os espectros foram processados com o software TOPSPIN 3.0.

ii) Estudo da interacção entre a PCc e o citocromo c_{552}

A amostra de citocromo c_{552} utilizada como titulado, na titulação seguida por ^1H -RMN, tinha a concentração de 234 μM e continha 10% de D_2O num volume total de 500 μL . A amostra de PCc utilizada como titulante tinha uma concentração de 2,6 mM (tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5).

Nesta parte do trabalho foi utilizado um espectrómetro de RMN de 600 MHz (Avance III Bruker), equipado com uma unidade de controlo de temperatura e uma criosonda TCI.

Os espectros foram obtidos por acumulação de espectros durante 20 minutos, a 298K, usando uma sequência de pulsos em que o sinal da água é eliminado e processados com o software TOPSPIN3.0. Os espectros foram adquiridos entre 50 ppm e -20 ppm.

iii) Determinação da constante de dissociação do complexo PCc-citocromo c_{552} por espectroscopia de ^1H -RMN

O equilíbrio termodinâmico entre a PCc e o citocromo c_{552} é caracterizado por uma constante de dissociação que, pode ser determinada pela titulação do citocromo a_{552} com PCc [195, 196]. A formação de um complexo PCc- c_{552} constituído por um monómero de peroxidase do citocromo c (PCc) (aceitador de electrões) e por um dímero de citocromo c_{552} (doador de electrões) pode ser representada pelo equilíbrio (equação 2.4):



Este equilíbrio caracteriza-se por um constante de dissociação do complexo, K_D , dada pela equação 2.5:

$$K_D = [c_{552}] \times [PCc] / [PCc-c_{552}] \quad (\text{Eq. 2.5})$$

As equações de conservação de massa (equação 2.6 e 2.7), para este equilíbrio são as seguintes

$$[c_{552}]_{\text{total}} = [c_{552}]_{\text{livre}} + [PCc-c_{552}] \quad (\text{Eq. 2.6})$$

$$[PCc]_{\text{total}} = [PCc]_{\text{livre}} + [PCc-c_{552}] \quad (\text{Eq. 2.7})$$

Substituindo na equação 2.5 a concentração do doador de electrões (citocromo) e a do aceitador de electrões (PCc) (Equação 2.6 e Equação 2.7) obtém-se (equação 2.8):

$$K_D \times [PCc-c_{552}] = ([c_{552}]_{\text{total}} - [PCc-c_{552}]) \times ([PCc]_{\text{total}} - [PCc-c_{552}]) \quad (\text{Eq. 2.8})$$

A concentração do complexo $[PCc-c_{552}]$ pode ser determinada pela resolução da equação 2.8.

Porque o sistema em estudo apresenta uma velocidade de permuta rápida entre a forma livre do citocromo c_{552} e a ligada à PCc (complexo $PCc-c_{552}$), a variação do desvio químico pode ser obtida pela equação 2.9

$$\sigma = \sigma_{\text{máx}} \times x + \sigma_{\text{min}} \quad (\text{Eq. 2.9})$$

onde x, que é a fracção do complexo $PCc-c_{552}$, pode ser determinado pela equação 2.10

$$x = [PCc-c_{552}] / [c_{552}]_{\text{total}} \quad (\text{Eq. 2.10})$$

Os parâmetros conhecidos nestas simulações são a variação do desvio químico ($\Delta\sigma$) e as concentrações iniciais de PCc e de citocromo c_{552} em cada ponto da titulação. As variáveis são a constante de dissociação (K_D) e a variação máxima de desvio químico ($\Delta\sigma_{\text{máx}}$).

2.7 Titulações potenciométricas: determinação do potencial formal

As titulações potenciométricas foram realizadas dentro de uma câmara anaeróbia com atmosfera de Argon (MBraun-modelo Unilab).

2.7.1 Calibração do eléctrodo combinado (platina, Ag/AgCl)

O eléctrodo combinado (Pt:Ag/AgCl, Radiometer), ligado a um potenciómetro (Crison), foi calibrado utilizando dois procedimentos distintos, o primeiro fora da câmara anaeróbia e o segundo dentro da câmara anaeróbia.

Procedimento 1

Fora da câmara anaeróbia, determinou-se o valor do potencial numa solução de quinidrona a pH 7,0 (potencial esperado +0,081 V) e de hidroquinona a pH 3,0 (potencial esperado +0,318 V), determinando-se o desvio do potencial experimental em relação ao esperado [219].

Procedimento 2 (câmara anaeróbia)

Dentro da câmara anaeróbia, o eléctrodo combinado foi calibrado com o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ - EDTA. Este par redox tem um potencial formal de +108 mV, a pH 5,0 [63]. Assim, medindo o potencial de duas soluções com proporções diferentes de espécie oxidada e reduzida, foi possível determinar a diferença entre o potencial apresentado pelo eléctrodo para uma solução com potencial formal conhecido (+196 mV) [63].

Iniciou-se esta calibração colocando o eléctrodo numa solução desarejada de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), com sulfato de amónio férrico 0,5 M e EDTA 10 mM. Adicionou-se a esta solução sulfato de amónio ferroso, de modo a que a sua concentração final fosse 0,2 mM, e mediu-se o potencial. Após esta medição, adicionou-se novamente sulfato de amónio ferroso, de modo a que a concentração final fosse 0,5 mM, medindo-se novamente o potencial. A diferença entre estes valores e os de referência ($E_{\text{Fe}} = +196 \text{ mV}$ e $E_{\text{Fe/EDTA}} = +108 \text{ mV}$) deverá ser de +59 mV para um eléctrodo calibrado [63].

2.7.2 Titulação potenciométrica

Após o desarejamento da solução de peroxidase do citocromo *c*, verificou-se que esta se encontrava parcialmente reduzida, sendo necessário reoxidar a enzima com ferricianeto de potássio 100 μM , antes de iniciar a titulação redox. As titulações foram realizadas a pH 7,5 (tampão HEPES, 10 mM) na presença de CaCl_2 (concentração inicial de 1 mM e concentração final de 0,83 mM em cada titulação) e na ausência de excesso de iões cálcio. A concentração de PCc variou entre 4 e 5 μM .

Usaram-se como agentes redutores ascorbato de sódio e ditionito de sódio e como agente oxidante ferricianeto de potássio. As concentrações das soluções de ascorbato de sódio (1 mM e 100 mM), de ditionito de sódio (10 μM e 100 μM) e de ferricianeto de potássio (5-50 mM) foram escolhidas de modo a obter pequenas variações do valor do potencial ($\sim 5 \text{ mV}$), por adição de pequenos volumes de solução (na ordem dos μL). As titulações iniciaram-se no sentido da redução, adicionando-se ascorbato de sódio ($E^{0'} \sim 0 \text{ mV}$, pH 7) e em seguida ditionito de sódio ($E^{0'} \sim -420 \text{ mV}$, pH 7), sendo deste modo possível variar o potencial entre +300 mV e -400 mV. No sentido da oxidação adicionou-se ferricianeto de potássio ($E^{0'} \sim +436 \text{ mV}$, pH 7).

Os mediadores foram escolhidos de acordo com a gama de potenciais a percorrer e de modo a não interferirem na região da banda α e β da PCc nem com o ponto isobéstico a 700 nm. As soluções de mediadores foram preparadas em solução tampão HEPES 10 mM pH 7,5) e desarejadas durante 30 minutos antes de introduzir na câmara anaeróbia. Na Tabela 2.5 é indicado o potencial de cada mediador.

Tabela 2.5 Mediadores redox usados e o respectivo potencial de redução a pH 7,0.

Mediador redox	E^0 (mV) [219]
Flavina mononucleotido (FMN)	-200
2-hidroxi-1,4-naftoquinona	-152
fenazina	-125
Fe^{2+}/Fe^{3+}	-76
duroquinona	+5
fenazina metosulfato (PMS)	+55
fenazina etosulfato (PES)	+80
1,2-naftoquinona	+180
Diaminodurool (DAD)	+220

O potencial da solução foi medido colocando o eléctrodo combinado numa célula de quartzo de 3 mL, a qual continha a solução de PCc totalmente oxidada (4- 5 μ M) e os mediadores (numa concentração final de 17 μ M). O espectro de visível (entre 300 nm e 900 nm) era traçado após cada adição de agente redutor ou oxidante quando o valor do potencial da solução estabilizava (entre 5 a 10 minutos após a adição do agente redutor ou oxidante).

2.7.2.1 Determinação dos potenciais formais por potenciometria

A PCc tem dois centros redox que podem, cada um deles, receber ou doar um electrão. Na determinação dos potenciais formais considerou-se que nunca ocorre simultaneamente a transferência de electrões entre os centros redox.

Para o ajuste das curvas experimentais utilizou-se o modelo de microestados, ou seja, considerou-se que ocorre a transferência de um electrão entre cada um dos quatro “microestados” PCc0, PCc1, PCc2 e PCc3 (Figura 2.7). Aplicou-se a equação de Nernst a cada um desses equilíbrios pelo que as curvas experimentais foram ajustadas a um processo monoelectrónico.

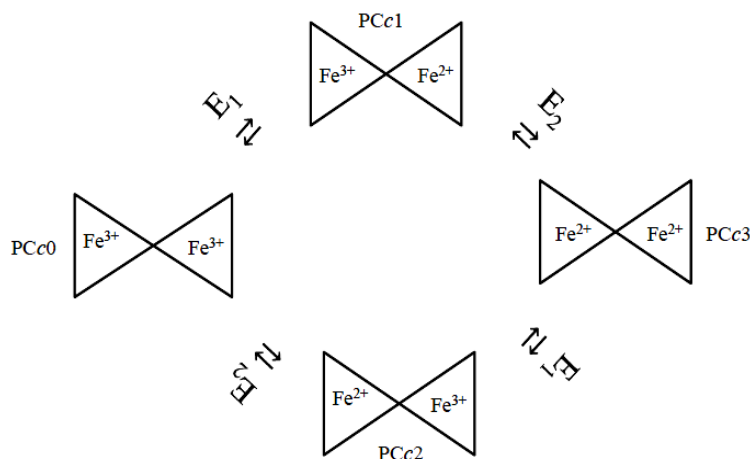


Figura 2.7 Esquema do modelo usado para simular as curvas de absorvância em função do potencial.

Considerando que no microestado PCc0 os dois hemos estão na forma férrica, que nos microestados PCc1 e PCc2 um dos hemos está reduzido e que no microestado PCc3 ambos os hemos estão reduzidos, foram deduzidas as seguintes equações, tendo em conta que $[PCc0] = X$, $[PCc1] = Y$, $[PCc2] = K$ e $[PCc3] = Z$:

$$E = E_1 + 59 \log (X/Y) \quad (\text{Eq. 2.9})$$

$$E = E_2 + 59 \log (X/K) \quad (\text{Eq. 2.10})$$

$$E = E_1 + 59 \log (K/Z) \quad (\text{Eq. 2.11})$$

$$E = E_2 + 59 \log (Y/Z) \quad (\text{Eq. 2.12})$$

$$X + Z + Y + K = 1 \quad (\text{Eq. 2.13})$$

logo

$$X = \frac{1 + 10^{((E-E_1)/59)} + 10^{((E-E_2)/59)} + 10^{((E-E_1)/59)} \times 10^{((E-E_2)/59)}}{10^{((E-E_1)/59)} \times 10^{((E-E_2)/59)}} \quad (\text{Eq. 2.14})$$

$$Y = \frac{X}{10^{((E-E_1)/59)}} \quad (\text{Eq. 2.15})$$

$$K = \frac{X}{10^{((E-E_2)/59)}} \quad (\text{Eq. 2.16})$$

$$Z = \frac{X}{10^{((E-E_1)/59)} \times 10^{((E-E_2)/59)}} \quad (\text{Eq. 2.17})$$

Os valores utilizados no ajuste das curvas de absorvância a 545 nm em função dos potenciais de redução (equação 2.18), foram obtidos por ajuste manual de parâmetros (E_1 , E_2 , e_X , e_Y , e_K e e_Z) que foram estabelecidos a partir dos dados experimentais

$$\text{Abs} = X \times e_X + Y \times e_Y + K \times e_K + Z \times e_Z \quad (\text{Eq. 2.18})$$

2.8 Métodos electroquímicos

Os ensaios voltamétricos foram realizados com um Potenciostato/galvanostato (AUTOLAB PSTAT10, Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands), como fonte de potencial aplicado e como aparelho de medida. Todo o sistema foi controlado com o *software* GPES da Eco Chemie. Os dados recolhidos a partir dos voltamogramas usando o *software* GPES foram posteriormente tratados e analisados usando o programa *Excel*.

A célula electroquímica utilizada era de um só compartimento e apresentava quatro entradas, para os três eléctrodos e para um tubo para o desarejamento da solução (Figura 2.8).

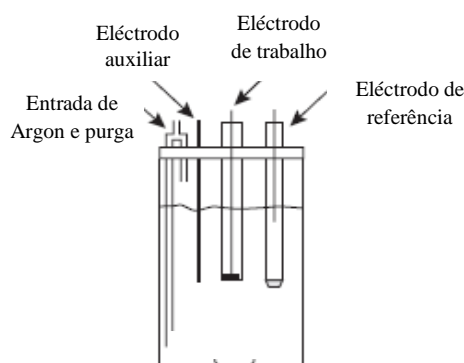


Figura 2.8 Esquema da célula electroquímica usada neste trabalho.

Os eléctrodos utilizados foram:

- Referência: eléctrodo de Ag/AgCl (BAS MF-2052, +205 mV vs ENH)
- Auxiliar: eléctrodo de platina
- Trabalho: eléctrodo de grafite pirolítica, com orientação basal (6,2 mm²);
eléctrodo de grafite pirolítica com filme de proteína (EGPF) (6,2 mm²);
eléctrodo de membrana de grafite pirolítica (EMGP) (6,2 mm²).

Neste trabalho todos os potenciais são referidos em relação ao eléctrodo padrão de hidrogénio (ENH).

Antes de cada experiência o electrólito (10 mL) foi desarejado durante 30 minutos com argon directamente na solução, e durante os ensaios manteve-se um fluxo constante de gás por cima da solução.

Para cada experiência foi realizado o respectivo ensaio “branco”, através do registo dos voltamogramas nas mesmas condições experimentais na ausência de proteína.

2.8.1 Voltametria cíclica

A velocidade de varrimento variou entre 5 mVs⁻¹ e 1 Vs⁻¹, numa gama de potenciais que variou entre -600 mV e +400 mV. Durante o varrimento de potencial foi aplicado um passo de 5 mV.

2.8.2 Voltametria de impulso diferencial

Na voltametria de impulso diferencial utilizou-se uma amplitude de impulsos de 50 mV, com uma duração de 50 ms e um tempo entre impulsos de 0,5 s, numa gama de potenciais entre -600 mV e +400 mV.

2.8.3 Preparação do eléctrodo

Antes de cada ensaio, o eléctrodo de trabalho (eléctrodo de grafite pirolítica) foi polido manualmente numa camurça de polimento (Buehler 40-7212), com uma suspensão de alumina de granulometria de 0,3 μm e lavado com água desionizada (Milli-Q). Seguidamente, fez-se novo polimento com outra suspensão de alumina 0,05 μm (Buehler 40-6365-006), lavou-se com água Milli-Q e secou-se com ar comprimido.

Para a caracterização electroquímica da PCc e o estudo da catálise mediada utilizaram-se dois procedimentos distintos para a preparação do eléctrodo:

Procedimento 1: Eléctrodo modificado com filme de proteína

Sobre a superfície do eléctrodo de trabalho previamente polido, lavado e seco colocaram-se 2,5 μL de solução de trabalho, os quais secaram à temperatura ambiente durante 30 minutos. Seguidamente, o eléctrodo foi imerso no electrólito suporte e traçaram-se os voltamogramas.

Procedimento 2: Preparação do eléctrodo de membrana

Depositou-se uma gota (2,5 μL) de solução de trabalho (solução que ficava retida dentro da membrana) sobre um pequeno quadrado ($\sim 2,25 \text{ cm}^2$) de membrana de diálise (Spectra/Por MWCO 3500, celulose regenerada com carga negativa). À superfície do eléctrodo de trabalho previamente polida, lavada e seca ajustou-se, com um pequeno anel de borracha, a membrana com a gota (Figura 2.9). Seguidamente, o eléctrodo foi imerso no electrólito suporte e traçaram-se os voltamogramas.

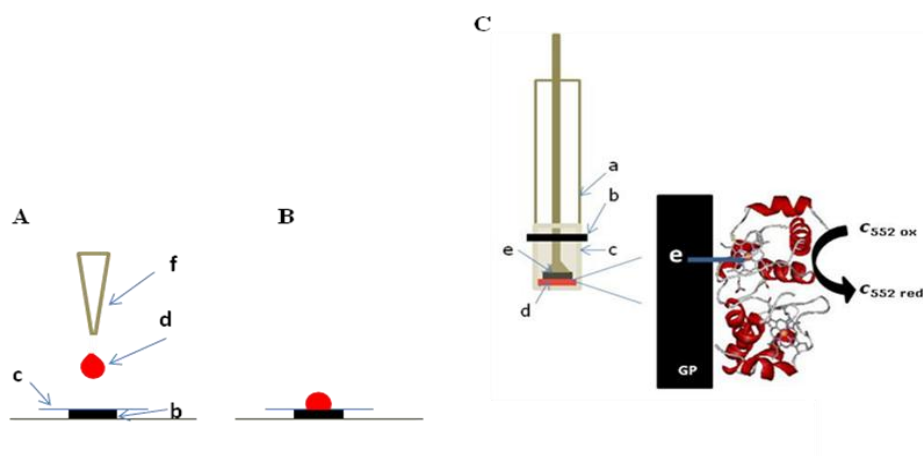


Figura 2.9 (A) e (B) Preparação do eléctrodo de membrana (EMGP), onde sobre a membrana de diálise (c), depositada em cima do anel de borracha (b) é colocada uma gota de solução de trabalho (d) com ajuda de uma micropipeta (f). (C) Esquema do eléctrodo de membrana: (a) eléctrodo de trabalho de grafite pirolítica; (b) anel de borracha; (c) membrana; (d) solução de proteína aprisionada, (e) grafite pirolítica. Junto da superfície do eléctrodo a proteína oxidada recebe electrões ficando reduzida.

A membrana de diálise retém a proteína na proximidade da superfície do eléctrodo e simultaneamente permite a difusão de pequenos iões ou moléculas.

2.8.4 Electrólito de suporte e soluções de trabalho

Da composição do electrólito de suporte faziam parte o CaCl_2 1 mM e o tampão 10 mM que variou com o pH pretendido.

No estudo do sinal de PCc a diferentes valores de pH, em condições não catalíticas e catalíticas, foram utilizados os seguintes tampões (10 mM): tampão acetato (pH 4,5- 5,0); tampão MES (pH 5,5); tampão HEPES (pH 6,0- 7,0) tampão bis-tris-propano (pH 7,5).

i) *Peroxidase do citocromo c de Ma. hydrocarbonoclasticus*

A solução usada para preparar o filme de proteína (EGPF) continha CaCl_2 1 mM, tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e PCc 100 μM . Após imersão do eléctrodo no electrólito traçaram-se voltamogramas de impulso diferencial e voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento (10 - 300 mVs^{-1}).

As soluções utilizadas para os ensaios com eléctrodo de membrana (EMGP) continham CaCl_2 1 mM, tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e PCc 100 μM . Após imersão do eléctrodo no electrólito traçaram-se voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento (10 a 300 mVs^{-1}).

ii) *Citocromo c_{552} de Ma. hydrocarbonoclasticus*

Para o estudo do sinal electroquímico do citocromo c_{552} usou-se um eléctrodo de membrana de grafite pirolítica (EMGP).

O electrólito de suporte era constituído por tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM.

Estudou-se o efeito da variação da concentração de citocromo c_{552} na solução trabalho através da realização de ensaios voltamétricos com concentrações de citocromo c_{552} de 35 μM , 71 μM e 141 μM em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM. Após imersão do eléctrodo no electrólito traçaram-se voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento (10 a 300 mVs^{-1}).

iii) *Determinação do coeficiente de difusão do citocromo c_{552} de Ma. hydrocarbonoclasticus*

Para a determinação do coeficiente de difusão do citocromo *citocromo c_{552} de Ma. hydrocarbonoclasticus* num eléctrodo de membrana de grafite pirolítica (EMGP), utilizou-se como electrólito de suporte tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM.

Estudou-se o sinal electroquímico de citocromo c_{552} na solução trabalho através da realização de ensaios voltamétricos com concentrações de citocromo c_{552} de 35 μM em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM. Após imersão do eléctrodo no electrólito traçaram-se voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento (10 - 300 mVs^{-1}). Quando o controlo da reacção de transferência electrónica é efectuada por difusão e o processo é reversível, a corrente do pico máxima é dada pela equação de Randles-Sevcik (equação 2.19)

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (\text{Eq. 2.19})$$

Para obter o valor do coeficiente de difusão, determinou-se o declive da recta da variação da correntes de pico (i_p) em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Este declive corresponde a $2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C$, onde n é o número de electrões trocados entre o eléctrodo e o citocromo, C é a concentração do citocromo, A a área do eléctrodo e D o coeficiente de difusão.

A área da superfície do eléctrodo de trabalho (6,2 mm^2) foi estimada usando um sistema com coeficiente de difusão conhecido, o ferricianeto de potássio, utilizando a equação de Randles-Sevcik e o procedimento experimental acima referido.

O valor do coeficiente de difusão determinado para o citocromo c_{552} de *Ma. hydrocarbonoclasticus* nestas condições foi de $(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

iv) Variação do pH

Para o estudo do efeito do pH no sinal do citocromo c_{552} preparou-se o electrólito de suporte num tampão “universal” 100 mM, a partir de uma solução de vários tampões (acetato de sódio/ácido acético, bis-tris-propano, MES e CAPS), cujo pH inicial foi ajustado para 7,5 e variou-se o seu valor pela adição de pequenas quantidades de NaOH 1 M ou de HCl 1 M.

A solução de trabalho consistiu em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5), CaCl_2 1 mM e citocromo c_{552} 35 μM .

Após cada adição de base ou ácido fez-se a leitura do pH, com um eléctrodo de pH previamente calibrado e imerso no electrólito e traçou-se um voltamograma cíclico (entre -50 mV e +450 mV) a uma velocidade de varrimento de 20 mVs^{-1} .

v) Variação da força iónica

A variação do sinal do citocromo c_{552} com a força iónica, a pH 7,5, foi estudada com uma solução de trabalho com citocromo c_{552} 35 μM , CaCl_2 1 mM e o tampão bis-tris-propano 10 mM. Variou-se a força iónica pela adição de pequenas quantidades de uma solução concentrada de cloreto de sódio (6 M, pH 7,5), numa concentração final que variou entre

10 mM e 900 mM, ao electrólito de suporte. Seguidamente, traçaram-se os voltamogramas cíclicos (entre -50 mV e +450 mV) a uma velocidade de varrimento de 20 mVs⁻¹.

vi) Ensaios em presença de PCc

Para se analisar a influência da presença de PCc na resposta do citocromo *c*₅₅₂ todos os ensaios anteriormente descritos para o citocromo *c*₅₅₂ foram realizados na presença de PCc. Preparou-se uma solução de trabalho com tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5), CaCl₂ 1mM, citocromo *c*₅₅₂ 35 µM e PCc 4,6 µM. Seguidamente, traçaram-se os voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento (entre -50 mV e +450 mV).

2.8.5 Estudo cinético da catálise medida

No estudo da catálise mediada usou-se um eléctrodo de membrana de grafite pirolítica, preparado como descrito anteriormente, e os ensaios foram realizados por voltametria cíclica entre -50 mV e +450 mV a uma velocidade de varrimento entre 10 mVs⁻¹ e 300 mVs⁻¹. Em todos os estudos electroquímicos inicialmente analisou-se o regime de transporte de massa e a reversibilidade do sinal do citocromo *c*₅₅₂. Usaram-se duas abordagens diferentes, variando-se a concentração de peróxido de hidrogénio numa delas e a concentração de PCc na outra.

i) Variação da concentração do peróxido de hidrogénio

As soluções de trabalho foram preparadas em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) com CaCl₂ 1 mM, citocromo *c*₅₅₂ 35 µM e PCc 4,6 µM. O electrólito de suporte era constituído por tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl₂ 1 mM.

Inicialmente, monitorizou-se o decaimento do sinal catalítico ($v = 20 \text{ ms}^{-1}$) ao longo do tempo, usando duas quantidades de peróxido de hidrogénio diferentes (500 µM e 1 mM).

Investigou-se, seguidamente, a variação do sinal catalítico com adição de quantidades diferentes de peróxido de hidrogénio, numa concentração final no electrólito suporte de 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 375 µM, 500 µM, 625 µM, 750 µM, 875 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2000 µM.

Os valores de K_m e $i_{m\acute{a}x}$ foram obtidos pelo ajuste directo de dados experimentais à equação de Michaelis-Menten e pela regressão linear de Eadie- Hofstee (representação de i_{cat} , em função de $i_{cat}/[H_2O_2]$).

ii) Variação da concentração de PCc

Para analisar a influência da concentração de enzima na catálise mediada, a solução de trabalho foi preparada em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5), CaCl₂ 1 mM, citocromo

c_{552} 35 μM e as seguintes concentrações de PCc: 1,1 μM ; 2,3 μM ; 4,6 μM ; 6,9 μM ; 9,2 μM ; 13,8 μM . Para obter os voltamogramas catalíticos adicionou-se peróxido de hidrogénio (1 mM) e traçaram-se os voltamogramas a 20 mVs^{-1} entre -50 mV e +450 mV.

2.8.6 Influência do pH na catálise mediada

Para se analisar a influência do pH na catálise mediada, utilizaram-se soluções tampão diferentes para cada valor de pH, entre pH 4,5 e 9. A solução de trabalho e o procedimento utilizado foi o descrito anteriormente (2.7.4 *iii*). A concentração final de peróxido de hidrogénio nestes ensaios foi de 1 mM.

O perfil de pH foi ajustado à equação 2.20

$$i_{\text{cat}} = i_{\text{máx}} / (1 + 10^{(\text{pK}_{\text{a}1} - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a}2})}) \quad (\text{Eq 2.20})$$

2.8.7 Influência da força iónica na catálise mediada

Para se analisar a influência da força iónica na catálise mediada, efectuaram-se dois procedimentos distintos que a seguir se descrevem.

i) Adição de NaCl à solução de trabalho e ao electrólito

As soluções de trabalho, preparadas em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 6,5) continham citocromo c_{552} 35 μM , CaCl_2 1 mM e PCc 4,6 μM . A variação da força iónica foi conseguida adicionando alíquotas de uma solução concentrada de NaCl (6 M, pH 7,5) ao electrólito e à solução de trabalho. O procedimento experimental foi o descrito anteriormente.

ii) Adição de NaCl ao electrólito

A solução de trabalho preparada tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 6,5 ou 7,5) continha citocromo c_{552} 35 μM , CaCl_2 1 mM e PCc 4,6 μM . A variação da força iónica foi efectuada adicionando diferentes volumes de uma solução concentrada de NaCl (6 M, pH 7,5), somente ao electrólito, esperando 5 minutos para se atingir o equilíbrio. Seguidamente, traçaram-se os voltamogramas.

2.9 Simulações de atracamento molecular

Neste estudo foi utilizado algoritmo BiGGER, que está incluído no programa Chemera, desenvolvido por Palma e Krippahl [200, 201].

Para efectuar o atracamento molecular utilizaram-se as estruturas publicadas no RCSB Protein Data Bank (PDB) da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* monomérica e dimérica na forma fechada e na forma aberta (IRZ6 e IRZ5, respectivamente), do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* dimérico (CNO) e do citocromo *c* de coração de cavalo (1HRC).

A simulação de atracamento molecular foi efectuada em duas fases. Na primeira, as proteínas em estudo são tratadas como corpos rígidos (assume-se que a conformação global da proteína não é alterada com a interacção com a outra proteína), fixando-se uma das proteínas numa determinada posição enquanto a outra (a sonda) é rodada e translacionada livremente sobre a primeira. Este primeiro passo tem como objectivo obter as posições possíveis entre as duas proteínas. Nesta fase, o BiGGER “pesquisa” no espaço (tridimensional) posições e orientações prováveis (soluções) para a interacção entre as proteínas, geradas pela rotação de 15° e translação de 1° da estrutura da proteína doadora de electrões (sonda) à volta da superfície da proteína aceitadora de electrões (alvo). Este algoritmo gera 5000 soluções putativas de atracamento, considerando como limite mínimo de contacto entre as duas proteínas 300 ou 500.

A segunda fase consiste na avaliação e seriação dos complexos gerados e seleccionados na primeira fase, utilizando a complementaridade da forma da superfície e das cadeias laterais, as interacções electrostáticas, o emparelhamento de aminoácidos ao longo das superfícies de contacto e a energia de solvatação que, em conjunto, resultam num valor de ordenação global.

Posteriormente, usando o programa Chemera, foram calculadas as distâncias entre o átomo de ferro do hemo E, e o átomo de ferro do centro hémico do citocromo *c*₅₅₂. Nesta fase, as melhores soluções com a menor distância entre os dois átomos de ferro referidos (a qual deverá ser inferior ou igual a 20 Å [191]) foram novamente ordenadas por hidrofobicidade e/ou por interacções electrostáticas, dependendo do carácter da interacção entre as proteínas do complexo em estudo [52, 197, 205, 206].

Os resultados de atracamento molecular foram analisados com o programa Chemera e com o programa *Excel*, onde foram seriados os melhores complexos. As imagens foram realizadas com os programas Accelrys ViewerLite 4.2 e Chemera.

CAPÍTULO 3| CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PEROXIDASE DO
CITOCROMO C DE *MARINOBACTER HYDROCARBONOCLASTICUS*

3.1 Optimização das condições de crescimento de *Ma. hydrocarbonoclasticus* para a produção de PCc

Com o objectivo de se obter a peroxidase do citocromo *c* efectuaram-se vários crescimentos da bactéria *Marinobacter. hydrocarbonoclasticus*, num microfermentador de 10 L em que se monitorizou o pH, a concentração de oxigénio e a densidade óptica a 600 nm.

Esta bactéria halofílica Gram-negativa, *Ma. hydrocarbonoclasticus*, utiliza como fonte de carbono e energia vários hidratos de carbono (lactato, citrato) é anaeróbia facultativa, isto é, utiliza como aceitador final de electrões tanto o dioxigénio como óxidos de nitrogénio e tem todas as enzimas para realizar a via de desnitrificação (redução do nitrato a azoto molecular) [34, 140, 212- 215].

A bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi cultivada em meio sólido sempre em condições aeróbias (30 °C), pelo método das estrias, a partir de uma cultura pura, tal como se descreveu no Capítulo 2| 2.1.3. Nas fases de crescimento seguintes, em meio líquido, utilizaram-se condições de microaerofilia estando os balões Erlenmeyer a 30 °C sob agitação orbital a 230 rpm. Entre cada inoculação decorria um período de 24 horas, sendo verificada a pureza da amostra por observação da cultura no microscópio óptico de elevada resolução, bem como o crescimento da cultura por leitura da densidade óptica a 600 nm.

Inicialmente, os crescimentos no microfermentador realizaram-se como descrito por Alves e colaboradores [70]. Essas condições de crescimento (Capítulo 2| Tabela 2.4, condição 1) diferem somente na quantidade de lactato usado (1 %) que neste trabalho de investigação foi de 0,8 %. No entanto, nessas condições a quantidade de PCc encontrada no periplasma foi muito reduzida, apesar da quantidade de citocromo *c*₅₅₂ ser elevada (Figura 3.1).

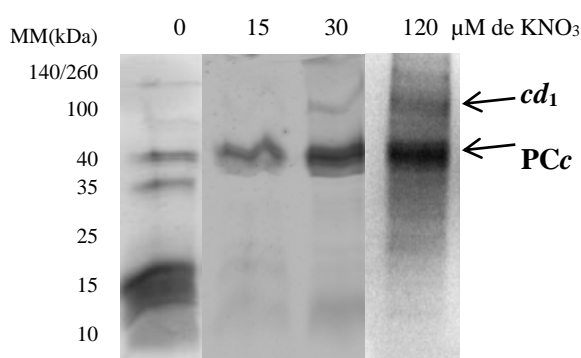


Figura 3.1 Electroforese em condições desnaturantes do periplasma de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, obtido em diferentes condições de crescimentos, realizados para a optimização da produção de peroxidase do citocromo *c* em que foram adicionadas diferentes concentrações de nitrato de sódio ao meio de cultura. Gel de poliacrilamida (12,5%) com coloração para hemos tipo *c*. Nos géis foram aplicadas amostras em que a relação volume de periplasma bruto/ volume da amostra aplicada no gel é igual. *cd*₁ - nitrito reductase, PCc - peroxidase do citocromo *c*.

A massa celular húmida obtida nas condições reportadas por Alves e colaboradores [65] variou entre 94 g e 98 g nos vários crescimentos efectuados, tendo-se obtido na purificação entre 0,045 μ mol e 0,092 μ mol de PCc, com uma razão de pureza entre 4,0 e 4,1.

De modo a enriquecer o extracto proteico inicial com a proteína de interesse, a PCc, efectuou-se uma optimização das condições de crescimento. Durante um dos crescimentos, foi adicionado fortuitamente ao meio de cultura uma quantidade vestigial de nitrato de sódio, tendo-se verificado que nesse crescimento a quantidade de PCc no periplasma era significativamente maior (dado não apresentado). Esta adição foi detectada devido à presença de nitrito reductase (citocromo *cd₁*) durante o primeiro passo cromatográfico da purificação de PCc (Figura 3.1). Esta enzima pertence à via de desnitrificação, cuja expressão do gene que a codifica depende da presença de nitrato [34, 98].

Assim, nos crescimentos subsequentes foram testadas quantidades de nitrato crescentes: 15, 30 e 120 μ M. A solução de nitrato de potássio era adicionada somente no último passo do crescimento, quando o meio líquido passava de balões Erlemeyer para o microfermentador. Nos géis revelados para a presença de hemos de tipo *c*, em que se colocou a mesma porção de volume/ volume de periplasma e amostra (Figura 3.1), é possível constatar o aumento da quantidade de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* no periplasma, com o aumento da quantidade de nitrato de sódio adicionado ao meio de cultura.

Verificou-se que a presença de nitrato no meio de cultura e condições de crescimento sob baixa tensão de oxigénio fazem aumentar a produção de PCc, Figura 3.1 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Massa de células húmidas obtida de 10 L de cultura de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e quantidade de PCc purificada, utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio.

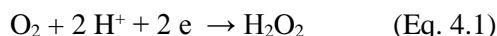
[KNO ₃] (μ M)	0	15	30	120
Massa de células húmidas (g)	94/98	100	107	111
Quantidade de PCc purificada (μ mol)	0,045/0,092	0,196	0,241	1,126

Uma vez que em crescimentos em condições desnitrificantes e anaeróbias de *Ma. hydrocarbonoclasticus* não foi detectada a presença de PCc no extracto periplásmico [70, 162], pode-se propor que a expressão do gene que a codifica dependa da presença de algum oxigénio no meio.

Uma explicação para a sobreexpressão de PCc poderá ser a presença de peróxido de hidrogénio no meio celular, consequência da existência de antraquinonas ou hidroquinonas, uma vez que estas espécies químicas ocorrem naturalmente em bactérias [32]. A auto-oxidação de antraquinonas ou a oxidação de hidroquinonas poderão ser a fonte de peróxido de hidrogénio na bactéria [32, 220].

No entanto uma outra explicação para o facto da PCc ser expressa em condições de baixa tensão de oxigénio poderá ser a presença de oxidases terminais que, em condições de

microaerofilia, não reduzem eficientemente o oxigénio molecular a água por terem menor afinidade para o oxigénio, ocorrendo a formação de peróxido de hidrogénio (equação 4.1) [30, 221 e 222]



Em estudos realizados, com a oxidase terminal de *Ma. hydrocarbonoclasticus* crescida em condições aeróbias verificou-se que esta reduz o oxigénio molecular a peróxido de hidrogénio e não a água (equação 4.1), verificando-se ainda que esta apresenta actividade de quinol oxidase [30, 221 e 222]. Assim o aumento da concentração de peróxido de hidrogénio irá promover a activação do regulador de transcrição que controla a expressão do gene *ccp*.

Está reportado em *Ps. aeruginosa* e *Pa. pantotrophus* [84, 93- 96] que a alteração do metabolismo aeróbio para anaeróbio, que ocorre quando a quantidade de oxigénio no meio diminui, é acompanhada pela repressão dos genes ligados ao metabolismo aeróbio, enquanto os genes ligados à respiração anaeróbia são induzidos [82- 84, 96]. Em *Pa. pantotrophus*, em resposta à privação de oxigénio, o gene *fnrP* controla a expressão do gene *nar*, que codifica para a reductase do nitrato, do gene *cco* que codifica para a oxidase *cbb₃* (uma oxidase terminal expressa em condições de baixa tensão de oxigénio) e do gene *ccp* que codifica para a peroxidase do citocromo *c* [31, 84 e 96]. Também em *Ps. stutzeri* é o gene *fnrA*, que codifica o regulador FNR que é expresso e controla a expressão da oxidase terminal, do citocromo *cbb₃* (gene *ccoN*), da peroxidase do citocromo *c* (gene *ccp*) e da oxidase coproporfirinogene III (gene *hemN*) [31, 54 e 88]. Nesta bactéria, quatro genes (*fnrA* e três homólogos *dnrD*, *dnrE* e *dnrS*) codificam para factores transcripcionais da família FNR, sendo que a transcrição de *dnrS* ocorre sob controlo de FnrA em condições de baixa tensão de oxigénio [96].

Os dados experimentais sugerem, pela primeira vez, a hipótese de que em condições de baixa tensão de oxigénio, tal como em *Pa. denitrificans* [83, 84, 86 e 95], *Ps. aeruginosa* [93 e 94] e *Ps. stutzeri* [54, 56], o FNR regula a expressão do gene que codifica para a PCc em *Ma. hydrocarbonoclasticus*. Este dado é reforçado pelo conhecimento de que a sequência de ADN reconhecida pelo FNR se encontra na zona a montante do local iniciação da transcrição do gene *ccp* tal como foi referido no Capítulo 1| 1.3.4 (Figura 1.1).

3.2 Purificação da peroxidase do citocromo *c* e do citocromo *c₅₅₂*

A PCc e o citocromo *c₅₅₂* foram purificados a partir do periplasma de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em três passos cromatográficos, como descrito no Capítulo 2| 2.1.3. Os espectros de absorção das fracções purificadas de PCc e de citocromo *c₅₅₂* apresentam-se em seguida (Figura 3.2 e 3.3), assim como a respectiva tabela de purificação (Tabela 3.2).

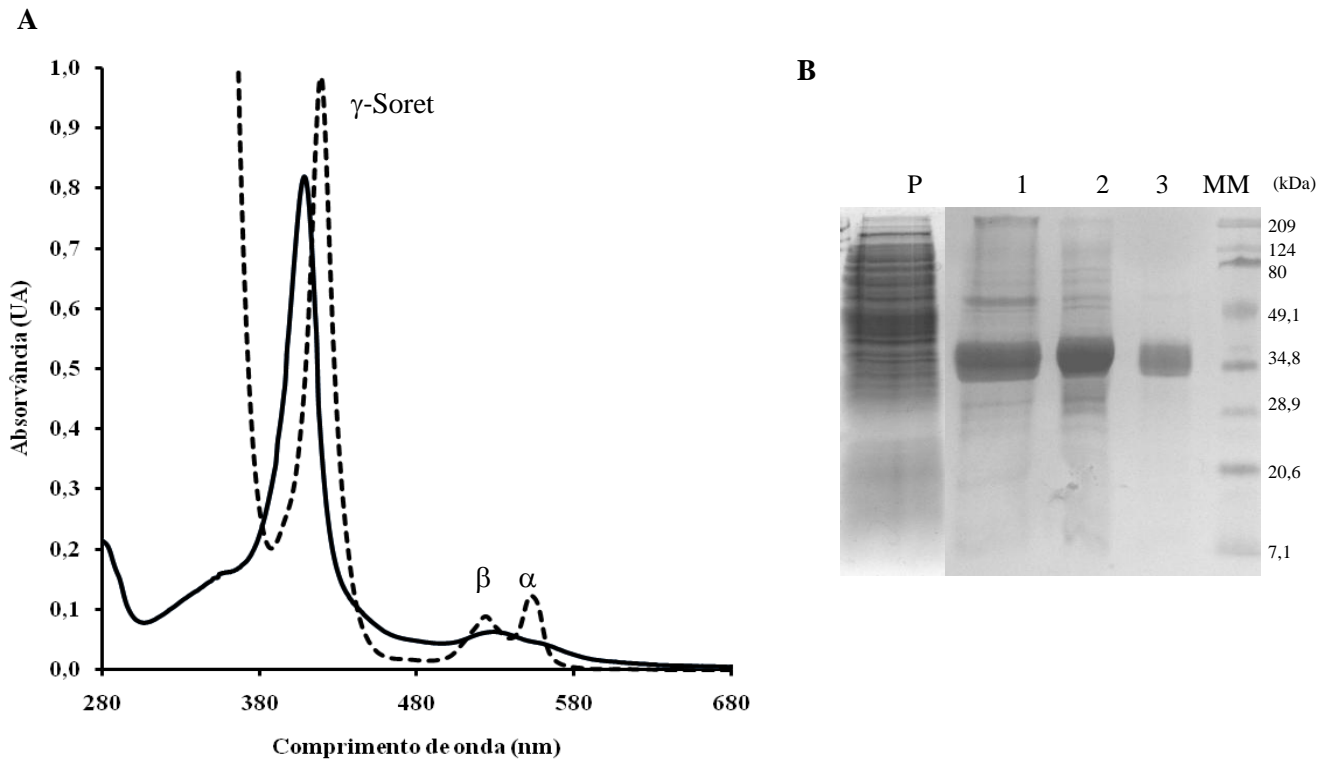


Figura 3.2 (A) Espectros de UV-visível de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 3,1 μ M em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), no final da purificação (—) e na forma reduzida (---) após a adição de ditonito de sódio. (B) Electroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida (12,5%) corado com Azul de Coomassie; P-periplasma, 1- fração de PCc que eluiu da coluna Source Q, 2- fração de PCc que eluiu da coluna superdex 200, 3- fração pura de PCc que eluiu da coluna HTP.

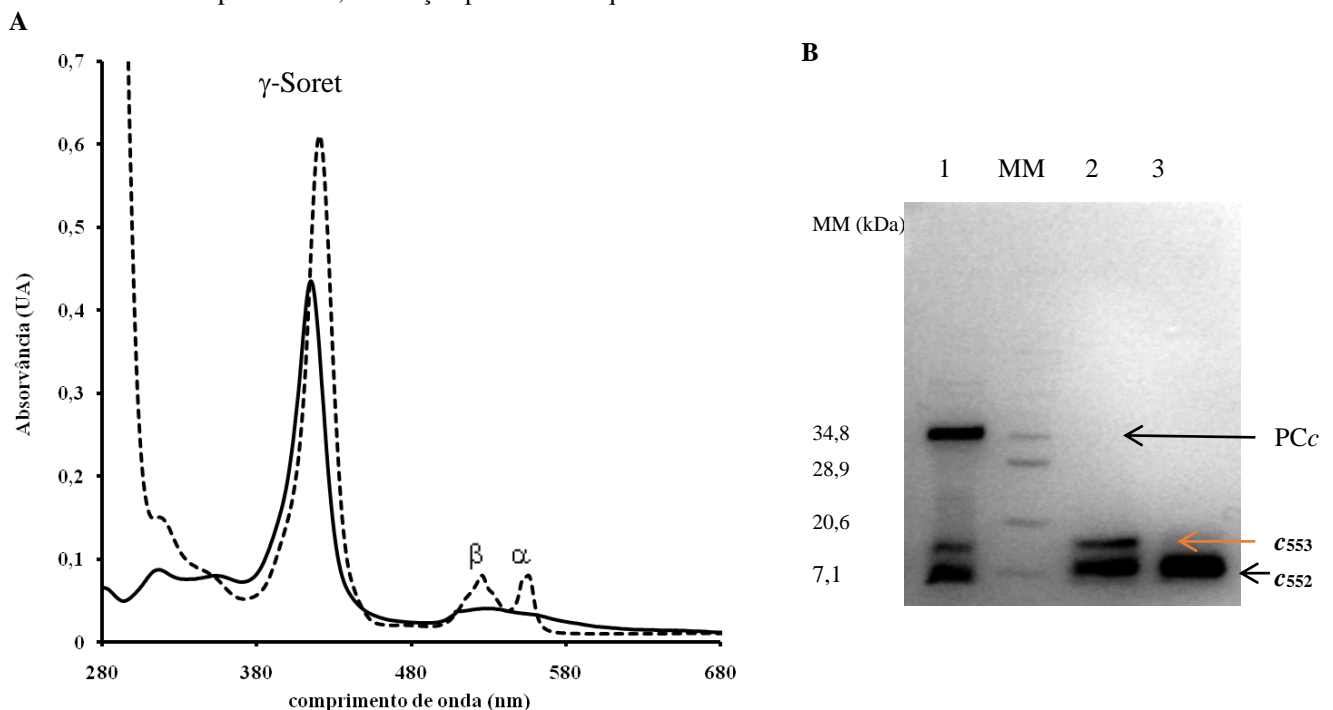


Figura 3.3 (A) Espectro de UV-visível do citocromo c_{552} 4,7 μ M em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,6). (—) Espectro do citocromo c_{552} puro e oxidado e (---) espectro do citocromo c reduzido. (B) Electroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida (12,5%) corado com azul de comassie, MM - padrões de massas moleculares. 1 - fração de citocromo c_{552} que eluiu da Source Q, 2- fração de citocromo c_{552} que eluiu da Superdex 75, 3 - fração pura de citocromo c_{552} que eluiu da HTP.

Tabela 3.2 Tabela de purificação da peroxidase do citocromo *c* e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

		Volume (mL)	Concentração (μmol/L)	Quantidade total de proteína (mg)	Razão de pureza	Rendimento η (%)
Peroxidase do citocromo <i>c</i>	Periplasma	500	-	546	0,8	-
	Source -Q	50	25	437*	2,1	-
	Superdex 200	30	34	238*	3,2	54
	HTP	5,6	225	45*	4,6	19
Citocromo <i>c</i> ₅₅₂	Periplasma	500	-	340	1,1	-
	Source -Q	100	260	308*	2,8	-
	Superdex 75	50	500	287*	4,5	93
	HTP	12	719	275*	6,0	89

*valores obtidos da purificação da fracção com maior razão de pureza entre cada passo cromatográfico

Ao longo da purificação, e dada a quantidade de PC_c, foram somente purificadas as fracções que apresentavam a razão de pureza mais elevada, tendo-se conseguido no final, PC_c com elevado grau de pureza e em maior quantidade.

A purificação apresentou um rendimento de 19 % para a PC_c ($R (A_{410nm}/A_{280nm}) \sim 4,6$) e de 89 % para o citocromo *c*₅₅₂ ($R (A_{410nm}/A_{280nm}) \sim 6$), tendo-se obtido 1,13 μmol de PC_c e 8,63 μmol de citocromo *c*₅₅₂.

3.3 Determinação da massa molecular aparente da Peroxidase do citocromo *c* e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

A massa molecular aparente da PC_c foi determinada através de uma cromatografia de exclusão molecular, a várias forças iónicas, na presença e na ausência de cloreto de cálcio. Foi utilizado como valor de referência, a massa molecular da PC_c determinada por espectrometria de massa, tendo em conta os hemis covalentemente ligados, 36575 Da [70].

Estudou-se o efeito da concentração de PC_c na sua massa molecular aparente, tendo-se obtido para uma solução de concentração inicial de 11,5 μM e de 22,5 μM uma massa molecular aparente de 67 kDa e de 72 kDa, respectivamente. Comparando estes valores obtidos por cromatografia de exclusão molecular, com a massa molecular obtida por espectrometria de massa, concluiu-se que, nas condições experimentais utilizadas, a enzima se encontra no estado dimérico. Verificou-se assim que, o aumento da concentração de PC_c não tem qualquer efeito na massa molecular da PC_c.

Estudou-se também o efeito da força iónica entre 0 e 800 mM na massa molecular aparente da PC_c e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, na ausência e na presença de ião cálcio (2 mM). Os resultados apresentam-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Variação da massa molecular aparente com a força iónica, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), [PCc]= 11,5 µM, [cit *c*₅₅₂]= 10 µM.

[NaCl](mM)	Massa molecular aparente (kDa)			
	PCc		Cit <i>c</i> ₅₅₂	
	Sem Ca ²⁺	Com Ca ²⁺ (2 mM)	Sem Ca ²⁺	Com Ca ²⁺ (2 mM)
0	63	-	18	-
10	62	-	18	-
50	78	84	28	20
150	73	71	-	16
300	62	-	17	-
800	72	76	21	19

Concluiu-se que a presença de iões cálcio e a variação da força iónica não têm qualquer efeito na estrutura quaternária da enzima, estando esta sempre na forma dimérica.

Uma vez que o ião cálcio não foi removido da PCc, a enzima deverá contê-lo na sua estrutura. A estrutura quaternária da PCc deverá ser então o resultado da presença de cálcio na estrutura da PCc, que segundo Dias e colaboradores, desencadeia alterações conformacionais que contribuem para reforçar as interações entre os monómeros da PCc [71]. O dímero de PCc deverá ser governado por forças hidrofóbicas o que explicará porque a variação da força iónica não altera a estrutura quaternária da enzima. Este resultado é importante porque mostra que, a pH 7,5, a PCc nativa já se encontra com a estrutura quaternária dimérica, não sendo necessário para isso a presença de iões cálcio em excesso.

Ao contrário do que acontece com as peroxidases do citocromo *c* de *Pa. pantotrophus* e de *Ps. aeruginosa*, em que a presença de iões cálcio promove a dimerização da enzima, a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* apresenta-se como dímero no estado nativo tal como a *Ps. stutzeri* [44, 46, 48, 58 e 126]. Em ensaios com *Pa. pantotrophus* e *Ps. stutzeri* o ião cálcio mostrou ser essencial para a dimerização, verificando-se que a remoção do mesmo por EGTA origina o aparecimento de formas monoméricas destas enzimas [48, 58]. De facto a área de superfície da interface entre monómeros da PCc de *Pa. pantotrophus* em valência mista (com cálcio na interface dos domínios) é maior do que na forma oxidada, o que segundo Echallier e colaboradores, pode explicar tanto a forte afinidade para o ião cálcio na forma de valência mista como a tendência da PCc estar dimérica quando se encontra nesse estado redox [53].

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 3.3, podemos verificar ainda que a massa molecular aparente do citocromo *c*₅₅₂ também não varia com o aumento da força iónica entre 0 mM e 800 mM de NaCl. Comparando estes valores obtidos por cromatografia de exclusão molecular com o obtido por espectrometria de massa, 9,45 kDa [163] conclui-se que nas condições experimentais utilizadas, o citocromo *c*₅₅₂ se encontra no estado dimérico. Tal como foi descrito por Brown e colaboradores, o citocromo *c*₅₅₂ é um homodímero a pH 7,5, em presença e na ausência de ião cálcio, mesmo a força iónica elevada [163].

A manutenção da estrutura quaternária da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a elevada força iónica indica que, a interacção entre monómeros é governada por forças hidrofóbicas e que o dímero se mantém nessas condições. A mesma conclusão se aplica ao citocromo *c*₅₅₂ desta bactéria, que mantém a estrutura dimérica a elevada força iónica, o que poderá estar relacionado com o facto de ambas as proteínas pertencerem a uma bactéria marinha halofílica.

Vários estudos realizados com PCc bacterianas mostraram que a conformação dimérica é requerida para a sua activação [44, 53, 58 e 80]. Estudos espectroscópicos e electroquímicos realizados com mutantes (E258K) da PCc de *Shewanella oneidensis* sugerem que a estrutura quaternária das PCc é necessária para estabilizar o tempo de vida da forma activa da enzima e assim não permitir a inactivação da enzima [80].

3.4 Caracterização espectroscópica da peroxidase do citocromo *c*

3.4.1 Espectroscopia de UV-visível

O efeito do pH na activação da PCc foi analisado por espectroscopia de visível, para valores de pH entre 4,5 e 8,5, com o intuito de compreender se o mecanismo de activação está associado a um efeito redox-Bohr e correlacionar estes resultados com as estruturas tridimensionais que foram obtidas a dois valores de pH (pH 4,0 e 5,3) [53, 71].

O efeito redox-Bohr reflecte uma interdependência termodinâmica entre a redução e a protonação de grupos e consiste num mecanismo cooperativo, entre o processo de redução de grupos redox e a protonação de grupos iónicos, causado por interacções electrostáticas entre os mesmos [223- 226]. A protonação e a transferência de electrões estão relacionadas com modificações das ligações de coordenação dos centros metálicos e o seu estado de valência e podem envolver efeitos conformacionais na proteína [224, 225].

Nestes ensaios foram adquiridos espectros do visível da PCc nativa, após a adição de ascorbato de sódio e DAD e durante um período de incubação no mesmo, tal como após a adição ião cálcio e um período de incubação com o mesmo. Verificou-se que em todos os pH estudados foi possível identificar os picos α e β , o que permitiu confirmar que mesmo a pH baixos (pH 4,5) ou elevados (8,5) o hemo E da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* sofre redução por acção do ascorbato, Figura 3.4.

Na Figura 3.5 e na Figura 3.6 apresentam-se ampliações dos espectros de visível da activação da PCc a diferentes valores de pH (Figura 3.4).

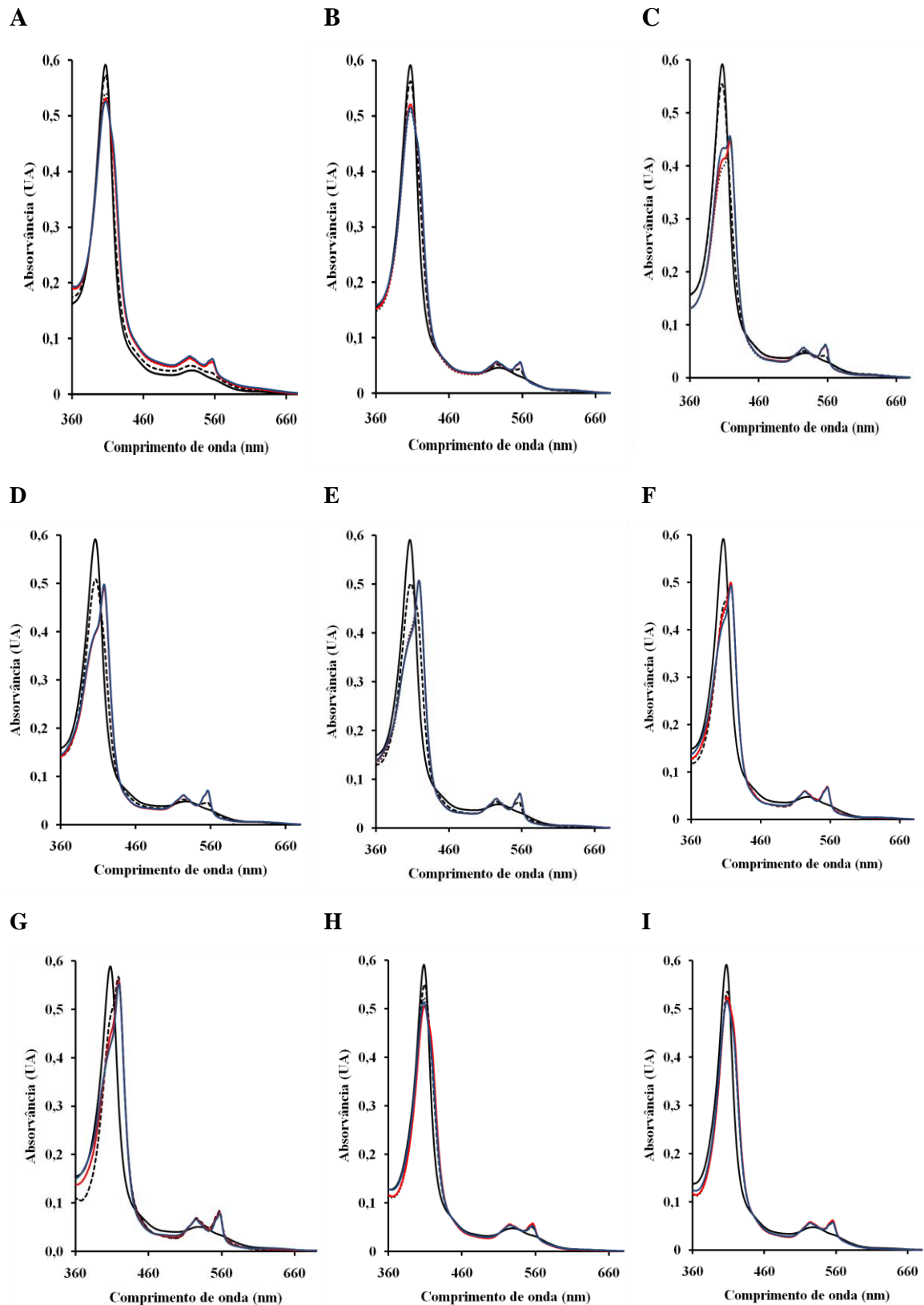


Figura 3.4 Espectros de UV-visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, a pH 4,5 (A), 5,0 (B), 5,5 (C), 6,0 (D), 6,5 (E), 7,0 (F), 7,5 (G), 8,0 (H) e 8,5 (I). PCc oxidada (—); PCc de valência mista após 1 minuto (---) e 20 min (....) de incubação com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (5 μ M), PCc de valência mista após 1 minuto (—) e 40 minutos (—) de incubação na presença de excesso de cloreto de cálcio (1 mM). Foi utilizado o tampão acetato/ácido acético para pH 4,5 e 5,0, tampão MES para pH entre 5,5 e 6,5, HEPES para pH 7,0, 7,5 e 8,0 e Tris- HCl para pH 8,5.

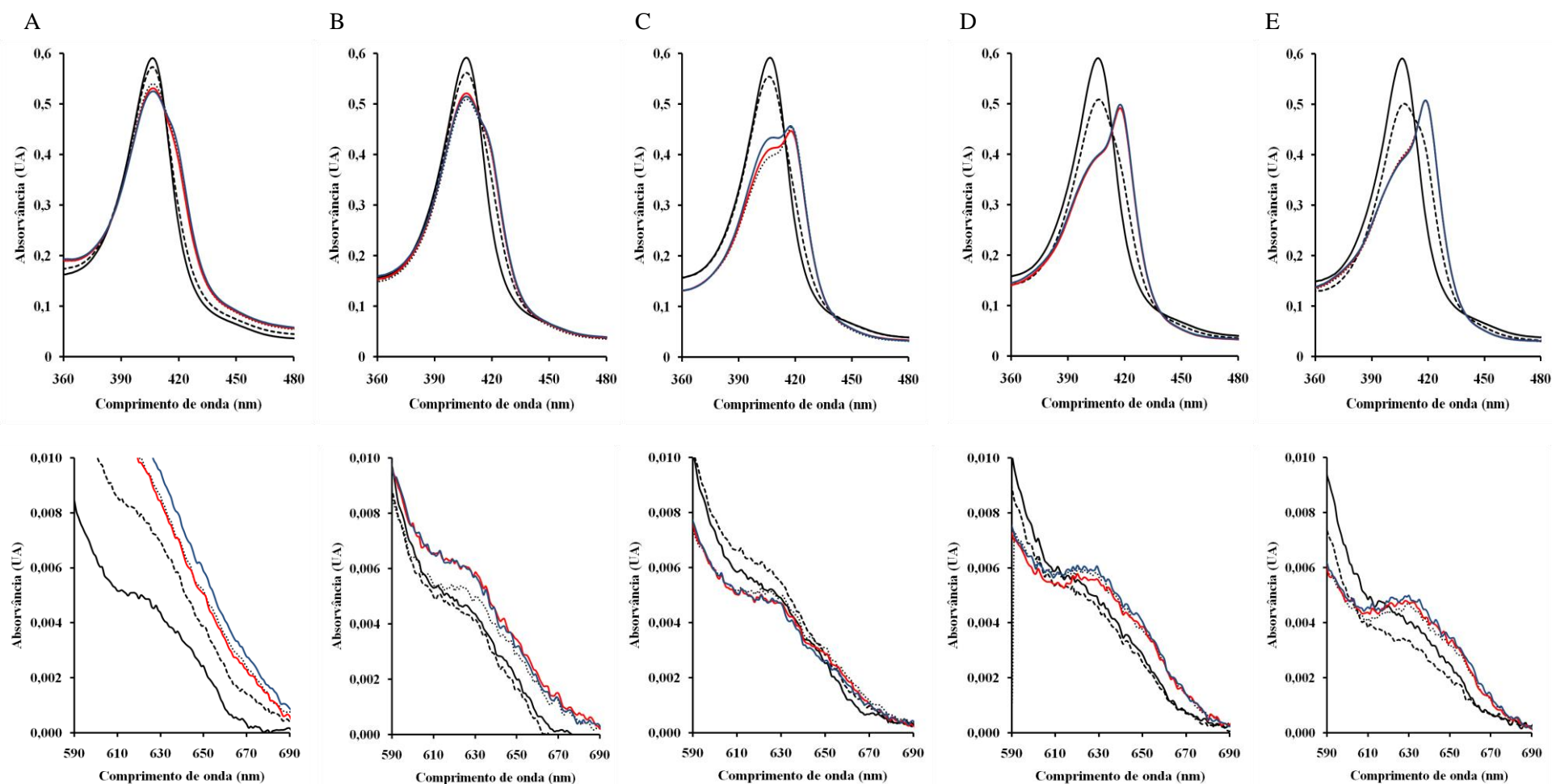


Figura 3.5 Espectros de UV-visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, a pH 4,5 (A), 5,0 (B), 5,5 (C), 6,0 (D) e 6,5 (F). Espectros entre 360 nm e 480 nm e espectros entre 590 nm e 690 nm. PCc oxidada (—); PCc de valência mista após 1 minuto (---) e 20 min (.....) de incubação com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (5 μ M), PCc de valência mista após 1 minuto (—) e 40 minutos (—) de incubação na presença de excesso de cloreto de cálcio (1 mM). Foi utilizado o tampão acetato/ácido acético para pH 4,5 e 5,0 e tampão MES para pH entre 5,5 e 6,5.

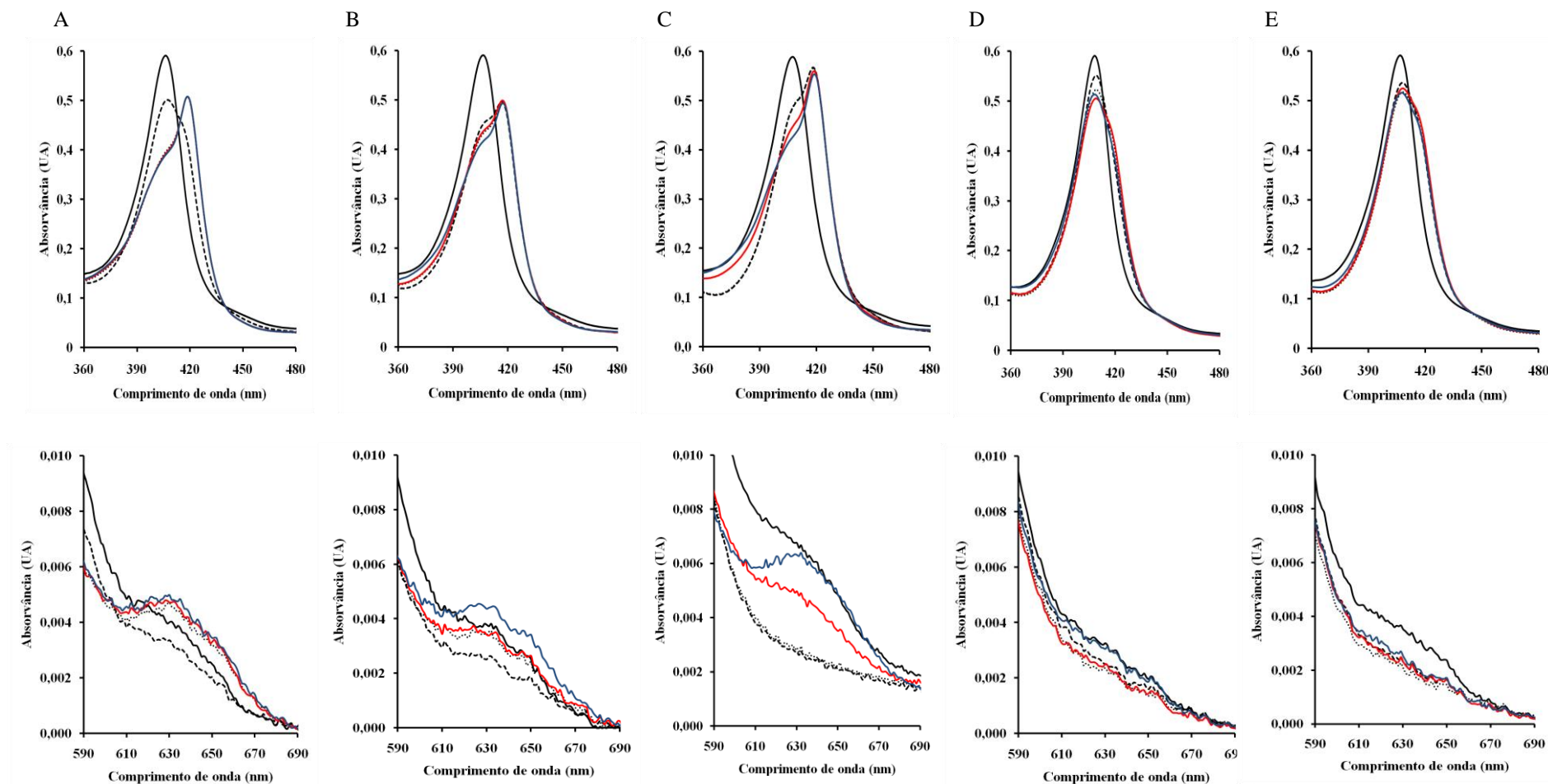


Figura 3.6 Espectro de UV-visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a pH 6,5 (A), 7,0 (B), 7,5 (C), 8,0 (D) e 8,5 (F). Espectro entre 360 nm a 480 nm e espectro de 590 nm e 690 nm. PCc oxidada (—); PCc de valência mista após 1 minuto (---) e 20 min (....) de incubação com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (5 µM), PCc de valência mista após 1 minuto (—) e 40 minutos (—) de incubação na presença de excesso de cloreto de cálcio (1 mM). Foi utilizado o tampão MES para pH 6,5, HEPES para pH 7,0, 7,5 e 8,0 e Tris- HCl para pH 8,5.

A PCc oxidada apresenta um espectro típico de um citocromo *c* (Figura 3.4) aos diferentes valores de pH, com uma banda de Soret, que resulta da transição de electrões da porfirina, das orbitais π ligantes para as π^* antiligantes, e uma banda de absorção a aproximadamente 527 nm, resultante de transições de electrões que ocorre entre as orbitais d-d do ferro hémico [46, 48 e 226]. Uma banda pouco intensa a 630 nm, resultante da transferência de carga entre as orbitais do átomo de ferro e os ligandos axiais, indica que um dos hemos está em equilíbrio spin-alto \rightleftharpoons spin-baixo [46, 48, 65 e 70]. Por comparação com o descrito na literatura, o hemo que está em equilíbrio de spin pode ser identificado como sendo o hemo E [46, 65].

A adição de ascorbato de sódio, na presença de DAD, à solução com PCc oxidada provoca alterações no espectro na zona do visível em todos os valores de pH. Nestas condições, no espectro do visível, o pico de Soret exibe um ligeiro alargamento a 417 nm, observando-se simultaneamente o aparecimento da banda β a 524 nm e da banda α a 556 nm, que estão relacionadas com a transferência de carga entre as orbitais π e π^* do ferro hémico e o anel pirrol [46, 48, 65, 70, 226]. O deslocamento da banda Soret para comprimentos de onda superiores depende do pH, aumentando de pH 4,5 até pH 7,5 a que se segue um deslocamento desta banda para comprimentos de onda menores com o aumento de pH. A perda de absorvância a 390 nm, após a redução da PCc com ascorbato de sódio/DAD, ocorre em todos os valores de pH. A redução do hemo E, coordenado axialmente com uma histidina e uma metionina, ocorre a um potencial redox mais elevado que o hemo P com coordenação bis-histidina, uma vez que está coordenado não só com uma histidina uma também com uma metionina, tendo esta última um átomo de enxofre electrofílico. Esta redução está completa ao fim de aproximadamente 2 minutos para todos os pH, no entanto só a pH 7,5 resulta na diminuição da absorvância a 630 nm (Figura 3.6-C). A pH entre 5,0 e 7,0, a redução do hemo E com ascorbato de sódio/DAD, origina a alteração configuracional do hemo P de spin-baixo para spin-alto, permanecendo o hemo E em spin-baixo. No espectro da valência mista da PCc na ausência de cálcio a pH 8,0 e 8,5 não surge a banda a 630 nm apresentando-se ambos os hemos em spin-baixo e hexacoordenados.

Após adição de iões cálcio, a pH 4,5 o espectro do visível da PCc em valência mista e na presença de cálcio não apresenta a banda a 630 nm (Figura 3.5-A). Entre pH 5,0 e 7,0 a banda a 630 nm não desaparece (Figura 3.5 e 3.6) e as características de spin-alto do hemo P são observadas não só a 630 nm como na banda de Soret que se apresenta assimétrica (Figura 3.5-C e D e Figura 3.6-A, B). A estes valores de pH, a adição de iões cálcio favorece a alteração de configuração do hemo P de spin-baixo para spin-alto. A adição de iões cálcio à PCc em valência mista a pH 7,5 resulta num ligeiro ganho de absorção a 390 nm que conjugado com o aumento

da banda a 630 nm, representa a transição de spin-baixo para spin-alto do hemo P no estado férrico. De facto, verifica-se pela análise dos espectros de absorção UV-visível (Figura 3.5 e 3.6) que a pH 7,5 só há aumento da banda a 630 nm quando se adicionam iões cálcio, enquanto a pH 6,0 e 6,5 isso ocorre logo que se forma o estado de valência mista. Verifica-se ainda que, a pH 7,5 é necessário incubar 5 minutos a PCc em estado de valência mista em cloreto de cálcio, para se observar o máximo da banda a 630 nm e que, somente a este pH se observa uma nítida separação entre o fenómeno de redução do hemo E, que leva ao desaparecimento da banda a 630 nm e a alteração de spin do hemo P que por sua vez origina o aparecimento dessa banda (Figura 3.6 -C). A pH 8,0 e pH 8,5 não se observa, nos espectros do visível, a banda a 630 nm indicativa da conformação de spin-alto mesmo após a adição de cálcio à PCc em valência mista (Figura 3.6-D, E).

Estes resultados revelam que a pH 4,5 a PCc em valência mista apresenta os hemos em spin-baixo. Este resultado está de acordo com a estrutura cristalina da PCc a pH 4,0 [71], onde na presença de iões cálcio, a enzima se encontra em valência mista, mas o hemo P permanece hexacoordenado (coordenado axialmente com duas histidinas) e o local do ião cálcio está ocupado por uma molécula de água [71]. O facto da adição de ião cálcio não promover a alteração de spin poderá indicar que a cavidade onde normalmente este se aloja, se alterou não permitindo a sua ligação ou já estava ocupada por água, com reportado anteriormente [53, 71].

Entre pH 5,5 e 7,0, a adição de iões cálcio à enzima em valência mista, acelera a conversão para spin-alto do hemo P. Este efeito foi também reportado para a PCc de *Pa. pantotrophus* [44, 46, 47, 126] estando relacionado com as alterações conformacionais durante a activação da PCc. Echalié e colaboradores propuseram com base nas estruturas cristalinas da PCc de *Pa. pantotrophus*, que estas alterações se iniciam com a modificação da rede de ligações de hidrogénio entre os grupos propiónicos hérmicos e os resíduos da proteína (*loop 3*, Figura 1.8), por reorientação de um propionato após a sua protonação [53]. Esta nova reorientação levaria a alterações conformacionais que desencadeariam um ajuste em toda a estrutura, sendo uma consequência do mesmo o fortalecimento da ligação entre a metionina e o ferro do hemo E ficando este hemo em spin-baixo. Assim, a redução do hemo E estará associada à protonação de um dos propionatos e a alterações conformacionais verificando-se o efeito redox-Bohr [53].

Da análise das estruturas cristalinas, efectuada por Dias e colaboradores, foi possível constatar que o dímero de PCc é estabilizado por interações hidrofóbicas entre as cadeias proteicas da interface dos monómeros e que a presença de iões cálcio contribui para interações mais fortes entre os mesmos [53, 71 e 126]. Considerando que a PCc se apresenta dimérica nestes ensaios (Capítulo 3| 3.3), a adição de iões cálcio à solução com PCc em valência mista não deveria alterar significativamente os espectros do visível, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo entre pH 5,5 e 7,0.

O facto de nestes valores de pH (5,5 e 7,0), a alteração do hemo P para spin-alto ocorrer rapidamente após a redução do hemo E, da elevada homologia estrutural entre a PCc de *Pa. pantotrophus* e de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e com base na alteração da conformação dos propionatos entre a estrutura aberta e fechada da PCc *Ma. hydrocarbonoclasticus*, propõem-se que o mecanismo de activação da PCc *Ma. hydrocarbonoclasticus* envolva um efeito redox-Bohr.

A pH 7,5, a redução do hemo E do dímero de PCc não desencadeia por si só a alteração da conformação do hemo P de spin-baixo para spin-alto. Verifica-se que inicialmente ocorre a alteração da conformação do hemo E, que está em equilíbrio spin-alto/spin-baixo e fica em spin-baixo. Esta alteração conformacional, tem como consequência o fortalecimento da ligação metionina-ferro hémico, permanecendo os dois hemos em spin-baixo, hexacoordenados—é proposto neste trabalho que esta estrutura corresponda a uma forma intermediária entre, a enzima oxidada e inactiva e a enzima em valência mista e activa. A última fase da activação, desencadeada pelos iões cálcio, irá levar a alterações conformacionais que alteraram as ligações de hidrogénio com propionatos do hemo P, com a consequente saída do ligando histidina 71, o que promoverá a alteração de spin do hemo P, que passa de spin-baixo para spin-alto, ficando pentacoordenado [53, 71].

A inactivação da enzima a pH 7,5, após redução do hemo E, poderá ser um mecanismo de sobrevivência da bactéria que será accionado somente em condições muito específicas como por exemplo pH 7,5 e baixa força iónica.

O aumento do pH não favorece a protonação dos propionatos, não sendo desencadeado o mecanismo de activação, ficando os dois hemos em spin-baixo a pH 8,0 e 8,5.

3.4.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica

A activação da PCc isolada de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi estudada utilizando espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE).

O ferro hémico no estado de oxidação +2 (estado ferroso) tem uma configuração electrónica $[Ar]d^6$, que se pode apresentar em spin-baixo ($S=0$) ou spin-alto ($S=2$) e no estado de oxidação +3 (estado férrico) essa configuração é $[Ar]d^5$, podendo ter spin-baixo ($S=1/2$) ou spin-alto ($S=5/2$). Os citocromos de spin-baixo na forma ferrosa não têm sinal de RPE, uma vez que o ião ferro é diamagnético, estando na configuração electrónica $[Ar]d^6$ ($S=0$) [133]. O espectro de RPE de um citocromo *c* reflecte as características de um sistema rômico, apresentando os valores de g_z , g_x e g_y todos diferentes [134-136].

Os sinais observados no espectro de EPR podem ser atribuídos a cada um dos hemos da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, por analogia com outras PCc já estudadas. Na Figura 3.7

apresentam-se os espectros de RPE da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma oxidada (Figura 3.7-A), no estado de valência mista (Figura 3.7-B) e no estado de valência mista após adição de íons cálcio (Figura 3.7-C), a pH 7,5.

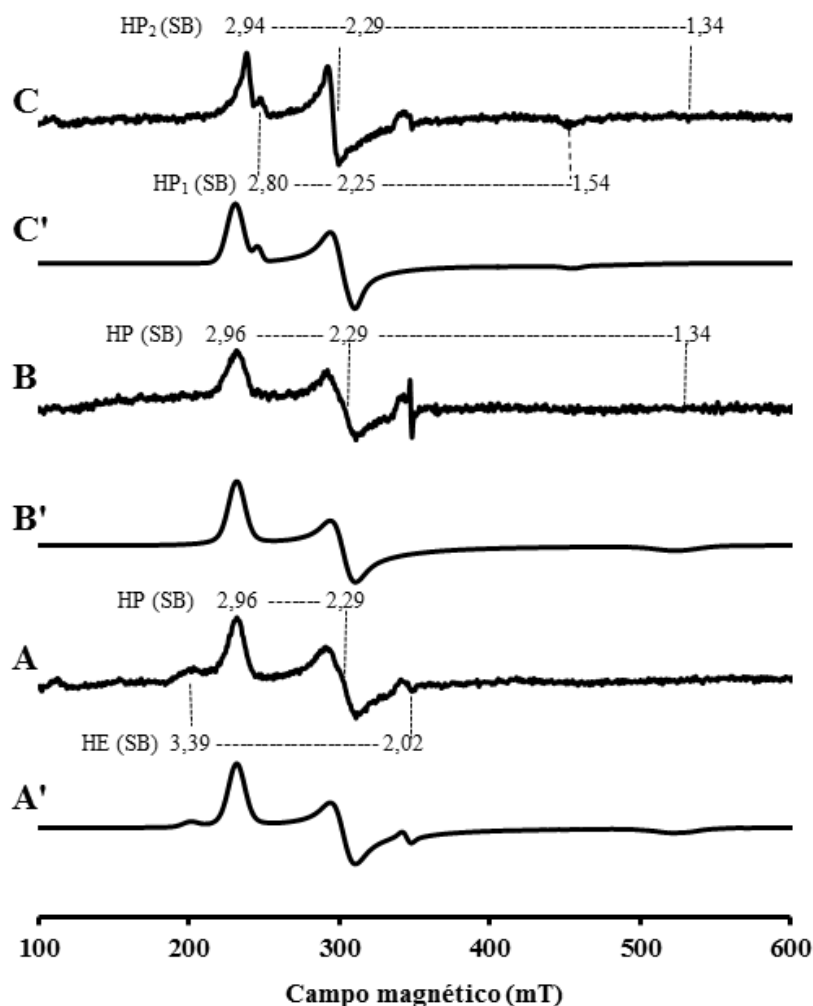


Figura 3.7 Espectros de RPE da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em Tris- HCl 10 mM (pH 7,5). No (A) estado oxidado, (B) no estado de valência mista e (C) no estado de valência mista incubada com excesso de íon cálcio (1 mM). Simulação do espectro de RPE da PCc oxidada (A'), da forma de valência mista (B') e da forma de valência mista incubada com excesso de íon cálcio (C'). Condições experimentais: Frequência de micro-ondas 9,65 GHz; temperatura 8 K; número de varrimentos 3; ganho 2×10^5 ; modulação de amplitude 5 Gpp; potência de micro-ondas, 0,635 mW, atenuação 25 dB. Os parâmetros usados na simulação (A') do hemo P foram: $g_z = 2,96$, $g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$ (spin-baixo, $S = 1/2$) e do hemo E foram $g_z = 3,39$, $g_y = 2,02$, $g_x = 0,60$ (spin-baixo, $S = 1/2$). Como existe só contribuição do hemo P em (B), os parâmetros usados na simulação (B') foram: $g_z = 2,96$, $g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$ (spin-baixo, $S = 1/2$). Para a simulação (C') foram usados os seguintes parâmetros: hemo HP_2 (spin-baixo): $g_z = 2,94$, $g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$ e para HP_1 (spin-baixo, $S=1/2$) e $g_z = 2,80$, $g_y = 2,25$, $g_x = 1,54$. Na figura estão identificados os valores de g e a sua atribuição em relação aos hemos.

O espectro de RPE (8 K) da PCc nativa é semelhante ao de outras PCc, apresentando características de sistema rômbo, com dois conjuntos de sinais, $g_z = 3,39$, $g_y = 2,02$ e $g_z = 2,96$,

$g_y = 2,29$, $g_x = 1,34$, indicativos de dois hemos em spin-baixo [46, 69]. Após a redução com ascorbato de sódio e DAD a espécie com $g_z = 3,39$ converte-se na forma ferrosa ($S = 0$) não havendo alteração do sinal a $g_z = 2,96$. Deste facto conclui-se que o sinal a $g_z = 3,39$ pode ser atribuído ao hemo E, enquanto o outro sinal corresponde ao hemo P que continua na forma férrica (Tabela 3.4). Nesta conformação o hemo P permanece em spin baixo e não surgem espécies com spin alto.

Tabela 3.4 Valores de g das ressonâncias observadas nos espectros de RPE da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* nas formas oxidada e de valência mista.

Hemos	Spin	PCc oxidada na presença de excesso de iões cálcio	PCc no estado de valência mista	PCc no estado de valência mista na presença de excesso de iões cálcio
HE	SB	$g_z = 3,39$ $g_y = 2,02$ (Fe^{3+} , $S=1/2$)	(não detecado) (Fe^{2+} , $S=0$)	(não detecado) (Fe^{2+} , $S=0$)
	SB	$g_z = 2,96$ $g_y = 2,29$ $g_x = 1,34$ (Fe^{3+} , $S=1/2$)	$g_z = 2,96$ $g_y = 2,29$ $g_x = 1,34$ (Fe^{3+} , $S=1/2$)	
HP				$g_z = 2,94$ $g_y = 2,29$ $g_x = 1,34$ (Fe^{3+} , $S=1/2$)
	HP ₂ SB			
	HP ₁ SB			$g_z = 2,80$ $g_y = 2,25$ $g_x = 1,54$ (Fe^{3+} , $S=1/2$)

HE- hemo de transferência de electrões; HP- hemo catalítico

Após a adição de iões cálcio, observam-se dois novos conjuntos de sinais com $g_z = 2,80$ e $g_y = 2,25$, que correspondem ao hemo P em spin-baixo - HP₁ e que apresenta conformação distinta do hemo P em spin-baixo - HP₂ com $g_z = 2,94$ e $g_y = 2,29$ (Figura 3.8, Tabela 3.4). Esta mudança do espectro de RPE corresponde a uma modificação estrutural nas proximidades do hemo P, que numa das formas (HP₁SB) se apresenta pentacoordenado mas cujo espectro de RPE tem valores de g para spin-baixo. Esta alteração conformacional não é consistente com a observação por espectroscopia do visível de que a PCc em valência mista, a pH 7,5, fica em spin-alto após a adição de iões cálcio observando-se a banda a 630 nm. A manutenção de spin-baixo do hemo P poderá ser devido ao hemo estar coordenado por uma molécula de água (8 K), apresentando o espectro de RPE sinais característicos de hemo hexacoordenado.

De facto na forma oxidada as PCc de *Ps. stutzeri* [55], *Ps. aeruginosa* [41], *Pa. pantotrophus* [49], *Sh. Oneidensis* [77] e *Mc. Capsulatus* [69] também apresentam dois conjuntos de sinais, um atribuído ao hemo E (que se caracteriza por um g_z entre 3,24 e 3,41) e outro ao hemo P (que se caracteriza por um g_z entre 2,93 e 3,01). Após a adição de ascorbato de sódio/DAD a estas PCc, no espectro de RPE só se detectam os sinais do hemo P em spin-baixo que permanece no estado férrico (Tabela 1.3, Capítulo 1| 1.3.9). No espectro da PCc de *Pa.*

pantotrophus surge um sinal a $g_z = 3,3$ atribuído ao hemo P em spin-alto [49], o mesmo sucedendo à PCc de *Ps. stutzeri* ($g_z = 2,94$) [55] e de *Ps. aeruginosa* ($g_z = 2,85$) [128]. No entanto esse sinal atribuído ao hemo P no estado férrico em spin-alto não surge no espectro da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mesmo após a adição de ião cálcio em excesso.

De salientar ainda que, tal como nos ensaios de espectroscopia do visível, a pH 7,5, a redução do hemo E da PCc não influenciou a conformação nas proximidades do hemo P uma vez que os sinais espectroscópicos não se alteram (o hemo permaneceu hexacoordenado). Após a adição de iões cálcio, tal como nos ensaios de espectroscopia do visível, é observável uma alteração do espectro de RPE que deverá corresponder a uma modificação nas vizinhanças do hemo P e indicia alterações na coordenação do mesmo (Tabela 3.4, Figura 3.7). Esta alteração conformacional detectada após a adição de iões cálcio é consistente com as evidências provenientes da espectroscopia do visível de que a PCc, a este pH necessita de iões cálcio para que as modificações ocorram, passando o hemo de hexacoordenado para pentacoordenado [70, 71]. A espécie identificada na Tabela 3.4 como HP₂SB poderá representar a enzima em valência mista inactiva, hexacoordenada (coordenação bis-histidina) e em spin baixo. Já a espécie HP₁SB poderá representar a enzima com valência mista na conformação activa, cujo hemo está coordenado com uma histidina e com uma molécula de água a 8 K, e que à temperatura de ambiente (~295 K) estará pentacoordenado em spin-alto.

3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (¹H-RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi usada para caracterizar a PCc nos diferentes estados de oxidação a pH 7,5. Esta análise só é possível, tal como em RPE, devido à presença de um centro paramagnético [196]. O ferro hémico comporta-se como um centro paramagnético no estado oxidado em spin-baixo (Fe^{3+} , $S=1/2$) ou quando se encontra em spin-alto quer esteja na forma férrica (Fe^{3+} , $S=5/2$) ou ferrosa (Fe^{2+} , $S=2$). Nos ferros hémicos, os electrões π do anel porfirínico deslocalizados geram uma corrente eléctrica que produz um campo magnético, estando os núcleos situados dentro (ligandos axiais) ou perto do mesmo, abrangidos por este campo magnético, que se opõe ao campo magnético exterior aplicado, o que provoca o deslocamento dos sinais desses núcleos para campos altos. Os núcleos que estejam fora do anel porfirínico, como é o caso dos grupos metilos do anel de porfirina, estão sujeitos a um campo magnético gerado pelos electrões π do anel porfirínico que reforça o campo magnético exterior e apresentam ressonâncias localizadas a campos baixos.

Os espectros de ¹H-RMN de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foram adquiridos num espectrómetro de RMN, a 400 Hz, numa gama de desvios químicos entre 100 e -20 ppm. Na Figura 3.8 apresentam-se os espectros numa gama de desvios químicos entre 90 e 15 ppm. Os

desvios químicos dos sinais observados, no espectro entre 10 e 90 ppm encontram-se listados na Tabela 3.5.

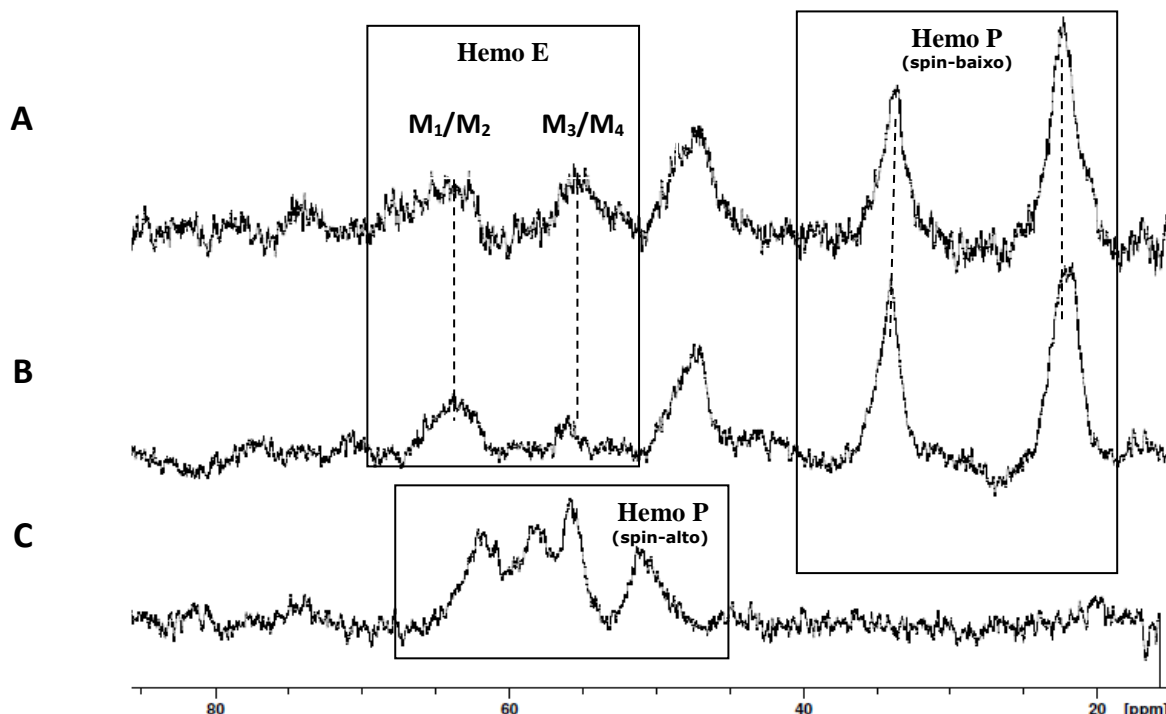


Figura 3.8 Espectros de ^1H -RMN de uma solução de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (827 μM), adquiridos num espectrômetro de RMN Avance a 400 Hz. (A) PCc oxidada, (B) PCc oxidada após a adição de cloreto de cálcio 2 mM e (C) PCc na forma de valência mista na presença de íons cálcio e de ascorbato de sódio 2 mM após 60 minutos de incubação. Condições experimentais: Tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), temperatura de 303 K, 10% de D_2O .

Em todos citocromos *c* as ressonâncias dos prótons pertencentes aos metilos do hemo, foram atribuídas aos carbonos com uma mesma numeração, utilizando a nomenclatura da IUPAC-IUB. Na Figura 3.9, apresenta-se o centro porfírina de um citocromo *c* onde se identificam em várias posições os grupos metilo M_1 , M_2 , M_3 e M_4 .

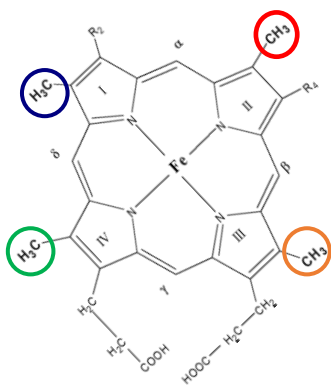


Figura 3.9 O anel da protoporfirina IX de um hemo tipo *c*, onde se destacam os quatro grupos metilo do anel e os quatro prótons meso (α, β, γ e δ). M_1 -Grupo metilo rodeado a azul, M_2 - Grupo metilo rodeado de vermelho, M_3 -Grupo metilo rodeado de laranja e M_4 - Grupo metilo rodeado de verde (Nomenclatura da IUPAC-IUB).

Tabela 3.5 Valores de desvio químico observado nos espectros de ¹H-RMN, entre 10 e 90 ppm, de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

Hemo	Ressonância (ppm)		
	PCc no estado oxidado	PCc no estado de valência oxidado na presença de excesso de íão cálcio ⁺	PCc no estado de valência mista na presença de excesso de íão cálcio ⁺
E	(M ₁) / (M ₂)	63,6	63,7
	(M ₃)	-	-
	(M ₄)	55,3	56,0
P	(M ₁) / (M ₂)	33,8	62,8/ 58,8
	(M ₃) / (M ₄)	22,5	56,2/ 51,5

No espectro de ¹H-RMN de PCc oxidada observaram-se dois conjuntos de ressonâncias, um entre 22,5 ppm e 33,8 ppm e outro entre 65,2 ppm e 48,2 ppm, que correspondem ao hemo P em spin-baixo e ao hemo E parcialmente em spin-alto, respectivamente [46, 55 150 e 206]. A adição de cálcio não altera o espectro da enzima oxidada. Este resultado está relacionado com o facto da estrutura quaternária da PCc não ser afectada pela presença de excesso de cálcio, como se verificou na secção 3.3.

A redução do hemo E pela adição de ascorbato de sódio transforma-o num centro diamagnético não sendo detectado por esta técnica. Assim o espectro de ¹H-RMN da PCc no estado de valência mista, na presença de excesso de íão cálcio, apresenta um único conjunto de ressonâncias entre 52,5 ppm e 62,8 ppm, que correspondem aos grupos metilo do hemo P. O desvio químico das ressonâncias desses grupos metilo para campo baixo indica que o hemo P está em configuração de spin-alto [46, 55, 150 e 206] pelo que deverá ter perdido a coordenação axial com a histidina 71, estando pentacoordenado, como se verificou no estudo realizado por espectroscopia de visível.

A espectroscopia de ¹H-RMN foi utilizada na caracterização da PCc de outros organismos, como *Pa. paracoccus* [46], *Ps. aeruginosa* [123, 124 e 128], *Ps. stutzeri* [55] e *Ps. perfectomarinus* [150]. Tal como a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* também estas enzimas apresentam, na forma oxidada, dois conjuntos de ressonâncias: um fortemente desviado para campo baixo (hemo E) e outro menos desviado, atribuído ao hemo P em spin-baixo. Após a redução pelo ascorbato de sódio, na presença de cálcio, todas as PCc apresentam ressonâncias fortemente desviadas para campo baixo, indicando que o hemo P está em configuração de spin-alto [46, 55, 150 e 168].

3.5 Determinação dos potenciais formais por potenciometria

Os potenciais formais de uma proteína fornecem-nos indicações sobre a estabilidade de um dado estado de oxidação. No caso das proteínas hémicas, alguns dos factores que influenciam esta estabilidade são o tipo de ligandos que coordenam o átomo de ferro, a carga da proteína, o ambiente em torno do hemo e o grau de exposição do hemo ao solvente [138, 227-229].

Com o objectivo de determinar os potenciais de redução da PCc, efectuou-se uma titulação potenciométrica sem adição de iões cálcio e na sua presença. Foi possível distinguir a contribuição de cada hemo, tanto no sentido da redução como no da oxidação nas duas situações estudadas (na presença e na ausência de excesso de iões cálcio), devido à diferença entre os potenciais formais dos hemos.

Seguidamente apresentam-se os espectros de absorção da PCc, entre 480 nm e 680 nm (Figura 3.10-A e B) na presença e na ausência de excesso de iões cálcio.

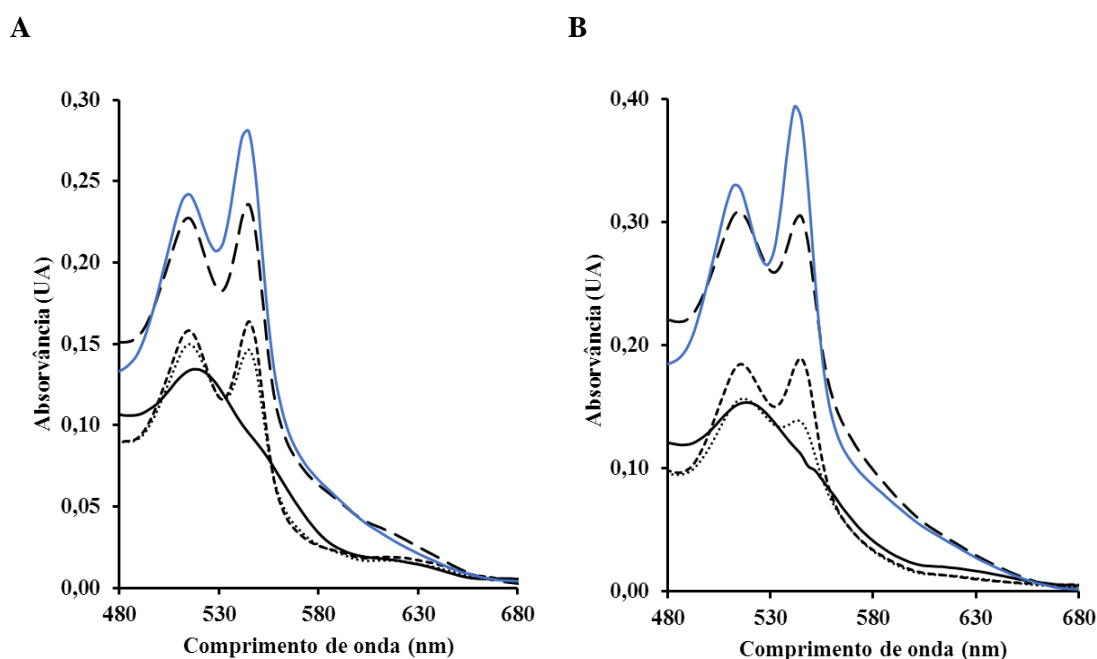


Figura 3.10 Espectros de visível da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* durante a sua redução, a pH 7,5, (A) na presença e (B) na ausência de excesso de iões cálcio. Em (A) (—) $E = +361$ mV, (·····) $E = +237$ mV, (- · - ·) $E = +38$ mV, (- - -) $E = -124$ mV, (—) $E = -327$ mV. Em (B) (—) $E = +210$ mV, (·····) $E = +148$ mV, (- · - ·) $E = +52$ mV, (- - -) $E = -128$ mV, (—) $E = -295$ mV. Condições experimentais: PCc 5,4 μ M, tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) (no início da titulação) na presença de mediadores e de CaCl_2 1 mM.

Durante redução da PCc, na presença de excesso de iões cálcio, a banda de Soret deslocou-se para comprimentos de onda maiores, a banda a 542 nm deslocou-se para 545 nm, mas a banda β não se altera. Durante a redução do hemo E (inicialmente em equilíbrio de spin) a banda a 630 nm manteve-se constante, aumentando após a redução do hemo P

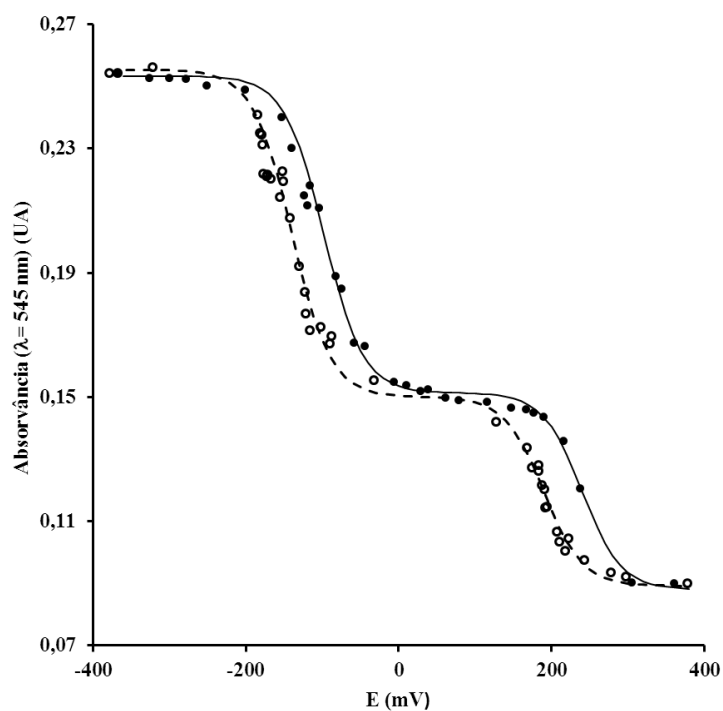
(Figura 3.10-A). Esta alteração de espectro da PCc em valência mista, para a PCc totalmente reduzida, deverá corresponder à alteração de spin-baixo para spin-alto do hemo P no estado férrico. Comportamento semelhante a este foi descrito durante a titulação potenciométrica da PCc de *Pa. pantotrophus* [46]. A oxidação da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* reduzida com ferricianeto de potássio reverteu o processo descrito anteriormente, finalizando a titulação com a PCc novamente oxidada.

Na titulação potenciométrica, sem adição de cloreto de cálcio, o espectro de absorção do visível da PCc oxidada foi semelhante ao observado em presença de excesso de íons cálcio (Figura 3.10-B). O entanto o espectro de visível após adição de ascorbato de sódio não apresenta a banda a 630 nm, que desaparece, não voltando a surgir durante a titulação no sentido da redução. Nestas condições há um deslocamento da banda α para comprimentos de onda de 538 nm e a banda de Soret desloca-se para maiores comprimentos de onda. Estes resultados mostram que a posição da banda α está dependente do estado de spin do hemo P da enzima, tal como acontece com a PCc de *Pa. pantotrophus* [46]. A redução do hemo P origina o aumento da absorvância (Figura 3.10-B, E= -128 mV e E= -295 mV) distinta em aparência da que foi observada em presença de íons cálcio (Figura 3.10-A, E= -124 mV e E= -327 mV), sendo possível distinguir os dois estados de spin atribuídos aos hemo P (spin-alto- na redução com ditionito na presença de excesso de íons cálcio e spin baixo- na redução com ditionito na ausência de excesso de íons cálcio) e ao hemo E (equilíbrio de spin- na redução com ascorbato de sódio na presença de excesso de íons cálcio e spin baixo - na redução com ascorbato de sódio na ausência de excesso de íons cálcio).

A atribuição de spin-alto ao hemo P reduzido na presença de excesso de íon cálcio foi apoiada em estudos de espectroscopia de Raman da PCc de *Pa. pantotrophus*, que provaram que o hemo P quando reduzido em presença de íons cálcio se mantém em spin-alto [126]. Neste estudo por espectroscopia Raman também se verificou que na ausência de íons cálcio, o hemo P da PCc na forma de valência mista se encontra hexacoordenado e em spin-baixo [126].

A determinação potenciométrica, de potenciais de oxidação-redução de cada um dos hemos PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* por espectroscopia do visível, seguiu as variações da absorvância a 545 nm em função do potencial da solução, considerando a absorvância a 700 nm como ponto isosbético. As curvas experimentais da absorvância em função do potencial foram ajustadas, como se descreveu no Capítulo 2| 2.7 (Figura 3.11).

A



B

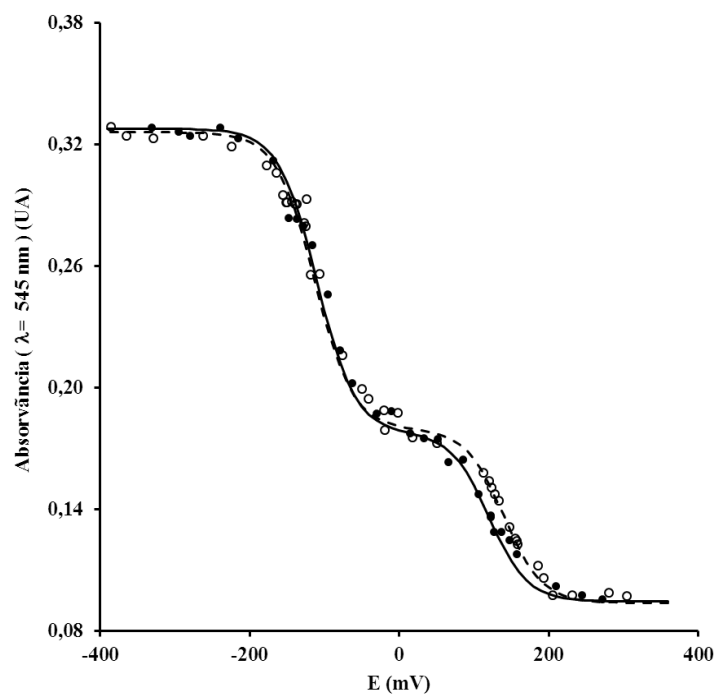


Figura 3.11 Curvas de titulação de oxidação-redução, seguida por espectroscopia de UV-visível ($\lambda = 545 \text{ nm}$), da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, (A) após a adição de íons cálcio e (B) sem adição de íons cálcio, em tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) na presença de mediadores. Titulação potenciométrica no sentido da redução (●) e no sentido da oxidação (○).

Os potenciais redox da PCc, na presença de excesso de íons cálcio, encontrados após o ajuste das curvas potenciométricas, são para o hemo E +230 mV (potencial obtido na titulação durante a redução da enzima) e +190 mV (potencial obtido na titulação durante a oxidação da enzima). O processo de oxidação do hemo P foi afectado pela presença de excesso de íons cálcio, sendo os potenciais encontrados -108 mV (potencial obtido na titulação durante a redução da enzima) e de -140 mV (potencial obtido na titulação durante a oxidação da enzima). Estas diferenças estarão relacionadas com as alterações conformacionais, e de coordenação de ambos os hemos.

Na potenciometria realizada sem adição de íons cálcio, os potenciais redox obtidos para o hemo E foram +120 mV e +140 mV, quando a titulação se efectuou no sentido da redução e da oxidação, respectivamente. Já os potenciais redox obtidos para o hemo P, na redução e oxidação da enzima formam muito semelhantes, -110 mV e -113 mV respectivamente.

Em presença de excesso de íons cálcio, o perfil de potencial redox da enzima apresenta uma ligeira histerese, na curva de absorvância em função do potencial, o que poderá estar relacionado com as alterações conformacionais sofridas pela PCc durante a redução do hemo E (Figura 3.11-A) [223- 226]. Durante a titulação potenciométrica na ausência de excesso de íons cálcio, não se observa histerese da curva tanto durante a redução como durante a oxidação da PCc (Figura 3.11-B), sendo os potenciais formais muito semelhantes na redução e na oxidação dos hemos (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Potenciais formais de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em tampão HEPES (pH 7,5) 10 mM.

	Potenciais formais de oxidação – redução (mV) ($\lambda = 545nm$)			
	Com adição de íons cálcio		Sem adição de íons cálcio	
	Hemo E	Hemo P	Hemo E	Hemo P
Sentido da redução	+230	-108	+120	-110
Sentido da oxidação	+190	-140	+140	-113

A titulação potenciométrica realizada em presença de íons cálcio, permitiu estudar as alterações sofridas por cada um dos hemos nessas condições. O hemo E que se encontra em equilíbrio de spin (spin-alto/spin-baixo) e hexacoordenado, após redução a +230 mV passa a estar em configuração de spin-baixo mantendo a coordenação Met-275 e His-201. Simultaneamente o hemo P na forma férrica, hexacoordenado (His-55 e His-71) e em spin-baixo adquire a configuração de spin-alto ficando pentacoordenado com a His-55 (a banda a 630 nm mantêm-se), saindo a His 71 da sua vizinhança [71]. Com a adição de ditionito, a PCc

é totalmente reduzida, permanecendo o hemo E na forma ferrosa em spin-baixo e o hemo P na forma ferrosa em spin-alto. As alterações configuracionais ocorridas durante a redução vão condicionar a oxidação.

Durante a oxidação da PCc totalmente reduzida, em presença de excesso de iões cálcio, os potenciais redox são mais baixos (ΔE (HP) = -32 mV, ΔE (HE) = -40 mV). Isto é, as alterações estruturais nas proximidades do hemo P ocorridas durante a redução, nomeadamente as alterações associadas ao efeito redox-Bohr, não são totalmente reversíveis, o que altera o potencial redox de ambos os hemos. Este facto pode ser explicado pela movimentação das cadeias proteicas, nomeadamente do loop que contém a His 71, que se move para a superfície da proteína e da consequente alteração da rede de ligações por pontes de hidrogénio e van-der-walls, dentro da estrutura. Tendo em conta que a metionina se encontra ligada ao hemo E, este resíduo poderá ter alterado a sua posição (quiralidade), ficando menos acessível o que poderá ter como consequência uma ligeira alteração de potencial do hemo E [229].

O processo redox que ocorre sem adição de cálcio é ligeiramente diferente do descrito anteriormente (com adição de cloreto de cálcio), os resultados mostram que, nestas condições experimentais, a redução dos hemos é reversível, ocorrendo alterações conformacionais reversíveis durante a oxidação e redução dos hemos [223, 224], que em presença de cálcio serão menos reversíveis (as curvas apresentam maior grau de histerese e os potenciais sofrem ligeiras variações). Isto é, nestas condições ocorre somente a redução/oxidação do ferro hémico, não havendo alteração de conformação e de coordenação nem efeito redox-Bohr, permanecendo os mesmos resíduos nas suas vizinhanças.

A titulação potenciométrica da PCc de *Pa. pantotrophus* também apresenta diferença entre os potenciais do hemo E na presença e ausência de cálcio [46], que é explicada como sendo o reflexo da influência do estado de spin do hemo P; quando o hemo E é titulado na presença de ião cálcio o hemo P está em spin-alto, mas na sua ausência estará em spin-baixo. O potencial formal do hemo E da PCc de *Pa. paracoccus* na ausência de cálcio foi de +176 mV e na sua presença de +226 mV. O potencial formal do hemo P foi difícil de determinar, variando entre -100 mV e -200 mV, o que foi atribuído à alteração de spin durante a titulação (Capítulo 1| Tabela 1.4).

De notar que, nas condições utilizadas, alguns iões cálcio poderão estar presentes, dado que a enzima não foi tratada com EGTA durante as titulações potenciométricas, não se verificando nestas condições as alterações encontradas na PCc de *Pa. paracoccus* na ausência de cálcio [46, 48]. Verificou-se no entanto que nas condições experimentais utilizadas (com ou sem adição de cloreto de cálcio) a presença do ião cálcio estabiliza a estrutura da PCc que permanece dimérica, tornando possível a titulação do hemo P.

3.6 Estudos por voltametria utilizando eléctrodos de grafite pirolítica com filme de proteína

A modificação da superfície do eléctrodo de grafite por um filme de proteína, desenvolvida pelo grupo de F. Armstrong, tem sido muito utilizada no estudo do comportamento electroquímico de metaloproteínas [230- 236]. A interacção entre o centro redox de uma proteína e a superfície de um eléctrodo possibilita estudar e caracterizar propriedades de transferência electrónica em sistemas biológicos onde aquela participa, uma vez que a superfície do eléctrodo poderá imitar o parceiro biológico [230, 235- 238]. Pressupõe-se ainda que a imobilização da proteína na superfície do eléctrodo permita que a mesma mantenha o seu estado nativo e a actividade biológica e, simultaneamente, promova a transferência directa de electrões entre a superfície daquele e o centro activo da proteína [234, 236, 239 e 240]. Estes estudos tem sido realizados predominantemente por voltametria cíclica, uma vez que esta técnica permite estimar o potencial formal de metaloproteínas bem como conhecer e compreender o seu comportamento em sistemas biológicos [240, 241].

A superfície da grafite apresenta características que fazem dela uma das melhores superfícies para interagir com proteínas [239- 242]. Esta contém vários grupos funcionais C-O hidrofílicos à superfície, que apresentam um valor de pK_a total de cerca de 5,6. Se o pH for inferior a 5,6, as áreas hidrofílicas estarão protonadas e a grafite está neutra; acima de 5,6 os grupos funcionais da superfície da grafite pirolítica (GP) ficam desprotonados e a superfície fica carregada negativamente [230- 232, 239 e 240].

Uma das vantagens da modificação da superfície do eléctrodo de grafite por filme de proteína é de apenas ser necessária uma quantidade muito pequena de amostra, sendo também evitadas limitações relacionadas com a difusão da proteína na solução [236, 240 e 241]. Outra vantagem da voltametria com filme de proteína é o uso do eléctrodo de GP como substituinte do doador fisiológico, possibilitando a obtenção de informações sobre as propriedades termodinâmicas e cinéticas do sistema biológico, bem como o estudo de mecanismos catalíticos [240, 241].

3.6.1 Voltametria cíclica

O comportamento voltamétrico da PCc foi estudado em condições estacionárias, com um eléctrodo de grafite pirolítica modificado com um filme de proteína (EGPF), como descrito no Capítulo 2| 2.8. Os ensaios realizaram-se com a enzima inicialmente no estado oxidado e na presença de iões cálcio, assumindo-se que a sua activação ocorre no decurso do ensaio, quando o hemo E recebe electrões do eléctrodo.

A caracterização electroquímica da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* iniciou-se pelo estudo do seu comportamento a pH 7,5 em presença de cloreto de cálcio (1 mM). Traçaram-se voltamogramas cíclicos entre +400 mV e -450 mV, usando diferentes velocidades de varrimento (Figura 3.12). Em condições não catalíticas, surge um pico catódico e um pico anódico, correspondentes a um mesmo processo de redução - oxidação, que aumentam com a velocidade de varrimento.

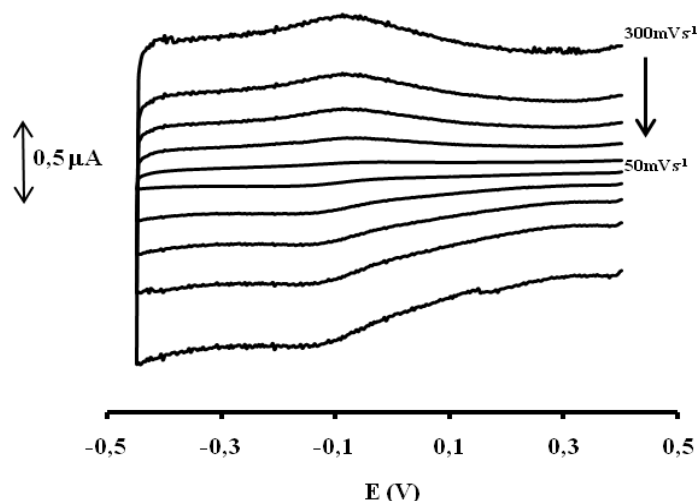


Figura 3.12 Voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento ($10 \leq v \leq 300 \text{ mVs}^{-1}$) da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 100 μM , num EGPF. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) e cloreto de cálcio 1 mM.

A partir dos voltamogramas cíclicos foram medidos os valores das amplitudes das correntes e dos potenciais dos picos para as diferentes velocidades de varrimento. Na Tabela 3.7 apresentam-se os valores de correntes (i_p) e potenciais (E_p) dos picos catódicos e anódicos, assim como a largura de pico a meia altura (δ) para a redução de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a diferentes velocidades de varrimento.

Tabela 3.7 Potenciais (E_p), correntes (i_p) e largura de pico a meia altura (δ) dos picos catódico e anódico dos voltamogramas cíclicos de PCc a diferentes velocidades de varrimento.

v (Vs^{-1})	E_p^c (mV)	i_p^c (μA)	δ (mV)	E_p^a (mV)	i_p^a (μA)	δ (mV)
0,020	-166	-10,6	111	-44	9,4	113
0,035	-156	-21,0	105	-44	19,7	101
0,050	-156	-20,6	116	-56	17,0	118
0,075	-144	-31,6	114	-82	33,3	100
0,100	-129	-46,5	105	-66	52,7	112
0,150	-129	-68,4	116	-86	76,9	104
0,200	-129	-94,0	107	-86	101,0	106
0,300	-129	-101,0	100	-86	130,0	100
0,400	-129	-153,0	108	-95	155,0	103
Mediana	-132 \pm 9		110 \pm 5	-71 \pm 10		105 \pm 5

Como se pode verificar na Figura 3.13, as correntes de pico variam linearmente com a velocidade de varrimento, indicando que o processo de transferência electrónica é controlado por adsorção.

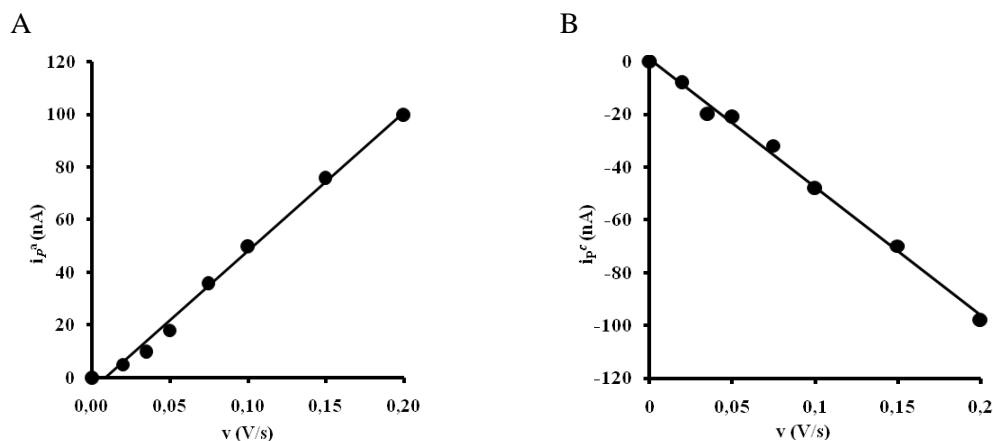


Figura 3.13 Variação das correntes do pico (A) anódico e (B) catódico com a velocidade de varrimento. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM.

O comportamento observado foi analisado utilizando a teoria da voltametria de adsorção [240- 244]. Os critérios de reversibilidade nestas condições são:

- E_p é independente da velocidade de varrimento
- $E_p^a - E_p^c = 0$ e independente da velocidade de varrimento
- $i_{pa}/i_{pc} \sim 1$ e independente da velocidade de varrimento

Pela análise dos dados experimentais, verificou-se que os potenciais anódicos e catódicos são praticamente independentes da velocidade de varrimento (Tabela 3.8). Como se pode observar na Tabela 3.8, os voltamogramas cíclicos para a redução da PCc apresentam as seguintes características: razão unitária para as correntes do pico anódico e catódico (i_p^a/i_p^c); constância dos valores de $(E_p^c + E_p^a)/2$ na gama de velocidades estudadas dentro do erro experimental. Deste modo é possível concluir, de acordo com a teoria da voltametria de adsorção, que se está na presença de um sistema quase-reversível [241- 244].

Tabela 3.8 Diferença entre o potencial anódico e o potencial catódico, ΔE_p , razão i_p^a/i_p^c e a média dos potenciais, a diferentes velocidades de varrimento dos voltamogramas cíclicos.

V (Vs^{-1})	$\Delta E_p = E_p^a - E_p^c$ (mV)	$ i_p^a/i_p^c $	$(E_p^c + E_p^a)/2$ (mV)
0,020	122	-0,88	-105
0,035	112	-0,94	-100
0,050	100	-0,83	-106
0,075	61	-1,05	-113
0,100	70	-1,13	-90
0,150	43	-1,12	-108
0,200	43	-1,07	-108
0,300	43	-1,29	-108
0,400	34	-1,01	-108
Mediana	71 ± 10	$1,1 \pm 0,1$	-107 ± 5

O potencial de meia onda, $E_{1/2}$, cujo valor pode ser determinado por $(E_p^c + E_p^a)/2 = E_{1/2}$, para um sistema reversível, permanece constante para todas as velocidades de varrimento, dentro de erro experimental, pelo que, mesmo tratando-se de um sistema quase-reversível, o potencial formal de redução pode ser estimado como sendo $E^{0'} = -107 \pm 5$ mV.

O valor da largura de pico a meia onda, δ (mV) ($\delta = 91/n$ (25° C) sendo n o número de electrões), indica o número de electrões trocados durante a redução [242- 244], sendo nestas condições transferido um electrão (Tabela 3.8).

Era espectável que, tal como na potenciometria, partindo-se da PCc oxidada esta ao ser reduzida ficasse em valência mista (o hemo E seria reduzido), surgindo um pico a uma potencial positivo, e com a continuação da redução surgisse outro pico a um potencial negativo correspondente á redução do hemo P. Tal não se verificou a pH 7,5, verificando-se o aparecimento de único pico de potencial no sentido da redução e da oxidação.

Efectuou-se um estudo idêntico ao que foi descrito para pH 7,5, para outros valores de pH, numa gama entre 5,5 e 7,5.

A análise dos voltamogramas cíclicos obtidos para valores de pH entre 5,5 e 7,5 (dados não apresentados) revelou um comportamento semelhante ao verificado para pH 7,5, observando-se o mesmo tipo de variação das correntes e dos potenciais com a velocidade de varrimento e o mesmo comportamento quase-reversível. Nos vários estudos realizados não se detectaram outros sinais numa gama de potenciais entre +450 mV e -450 mV

A variação do potencial formal da PCc oxidada com o pH é apresentada na Figura 3.14. Esta dependência pode ser traduzida pela equação de Nernst (equação 3.1), quando se atinge uma situação de equilíbrio químico, em que há transferência de um protão durante a redução [227]

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \text{pH} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

onde RT/F a 25 °C tem o valor de 59 mV e n é o número de electrões .

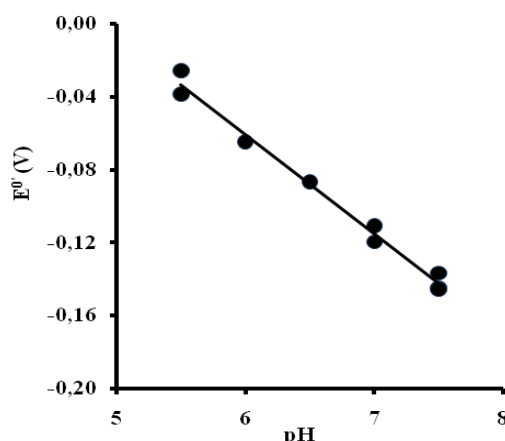


Figura 3.14 Variação do potencial formal, E^0 , da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com o pH, determinada por voltametria cíclica usando um EGPF ($E^0 = 266 - 54 \text{ pH (mV)}$, $r = 0,99$).

Os resultados obtidos para a dependência do potencial formal, E^0 , sugerem que ocorre a transferência de um próton por cada electrão durante a redução da PCc oxidada, uma vez que o declive da recta é próximo de 59 mV por unidade de pH.

O potencial formal apresenta uma dependência linear do pH da solução (efeito redox-Bohr) indicando que a transferência de electrões está associada à transferência de protões, o que reflecte interações electrostáticas entre grupos protonáveis próximos do ferro hémico, como os propionatos e o próprio átomo de ferro [227- 229]. O potencial formal dos grupos redox depende do pH, do mesmo modo que os valores do pK_a dos grupos protonáveis são influenciados pelo potencial redox. Verifica-se que a valores de pH baixos, os grupos protonáveis têm maior probabilidade de estarem ocupados, aumentando a carga positiva da molécula e facilitando a captura electrónica, que ocorre a potenciais mais elevados [223- 226]. A captura concertada de protões e electrões ocorre em todas as proteínas redox a alguns valores de pH, tornando-se relevante quando ocorre a pH fisiológico.

3.6.2 Voltametria de impulso diferencial

O comportamento electroquímico da PCc oxidada também foi estudado usando eléctrodos de grafite pirolítica com filme de proteína (EGPF) por voltametria de impulso diferencial a pH 7,5, em presença de cloreto de cálcio. Nestes voltamogramas observaram-se inicialmente dois sinais a potencial, $E_p = -67 \text{ mV}$ (E_1) e a $E_p = -232 \text{ mV}$ (E_2). O sinal mais catódico (E_2) desapareceu ao longo do tempo, mas o sinal mais anódico (E_1) permaneceu sempre visível.

Nos estudos realizados não se detectaram outros sinais na gama de potenciais entre +400 mV e -600 mV.

Para identificar a origem destes dois sinais, fizeram-se outros estudos com EGPF a pH 7,5. Para comparar com os resultados do estudo da activação por espectroscopia de visível, o comportamento da enzima foi analisado em condições semelhantes, usando voltametria de impulso diferencial:

(i) não se adicionou ião cálcio em excesso ao electrólito suporte (dados não apresentados);

(ii) efectuou-se a pré-redução da enzima com ascorbato em presença de DAD, na presença (Figura 3.15) e na ausência de cálcio (dados não apresentados).

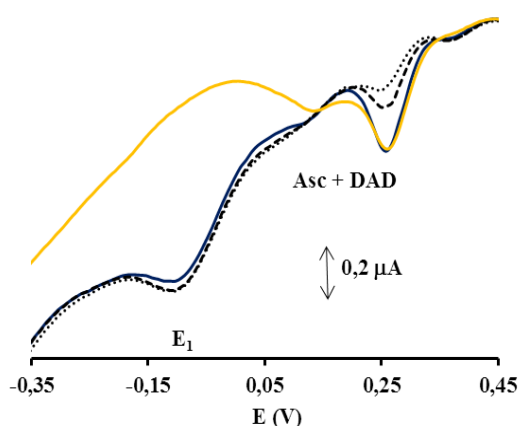


Figura 3.15 Voltamogramas de impulso diferencial de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, (100 μ M), obtidos com um EGPF em presença de Ascorbato de sódio (1mM), DAD (2 μ M). (—) Primeiro, (---) segundo e (...) terceiro voltamogramas consecutivos. (—) Voltamograma de impulso diferencial obtido com um eléctrodo de grafite pirolítica onde secou, durante 30 minutos, uma solução com ascorbato de sódio (1mM), DAD (2 μ M) e cálcio 1 mM. Electrólito HEPES 10 mM (pH 7,5) em presença de cloreto de cálcio 1 mM.

A ausência de excesso de cálcio na solução não provocou qualquer alteração nos voltamogramas da PCc. Isto é, surgiram dois picos desaparecendo o sinal mais catódico rapidamente enquanto o outro, a potenciais mais altos permanece. Com base nos resultados de espectroscopia do visível a pH 7,5, e nestes dados é possível concluir que, se o processo redutivo que ocorre junto do eléctrodo é indiferente à presença ou ausência de iões cálcio em solução, não está relacionado com a activação da enzima.

Após a pré-redução com ascorbato de sódio em presença de DAD foi apenas detectado o pico E_1 , Figura 3.15. Em nenhuma das situações surgiu qualquer outro sinal. Considerando que o hemo E se reduz com o ascorbato, o sinal encontrado deverá provir da redução do hemo P, ou do hemo E de uma forma não nativa da PCc. Para além desta conclusão é possível inferir que o sinal que permanece sempre visível em voltametria de impulso diferencial, E_1 , deverá corresponder ao anteriormente observado em voltametria cíclica, uma vez que ocorre a um potencial semelhante.

O sinal E_2 foi atribuído à redução do hemo P hexacoordenado onde o ião ferro está na forma férrica, passando este à forma ferrosa. Este último sinal com o decorrer do tempo desaparece. A sua redução é irreversível, o que origina o decaimento do sinal ao longo do tempo.

Para verificar se a redução da PCc junto do eléctrodo é o processo de activação, estudou-se utilizando voltametria de impulso diferencial o comportamento da PCc a diferentes valores de pH ao longo do tempo, Figura 3.16.

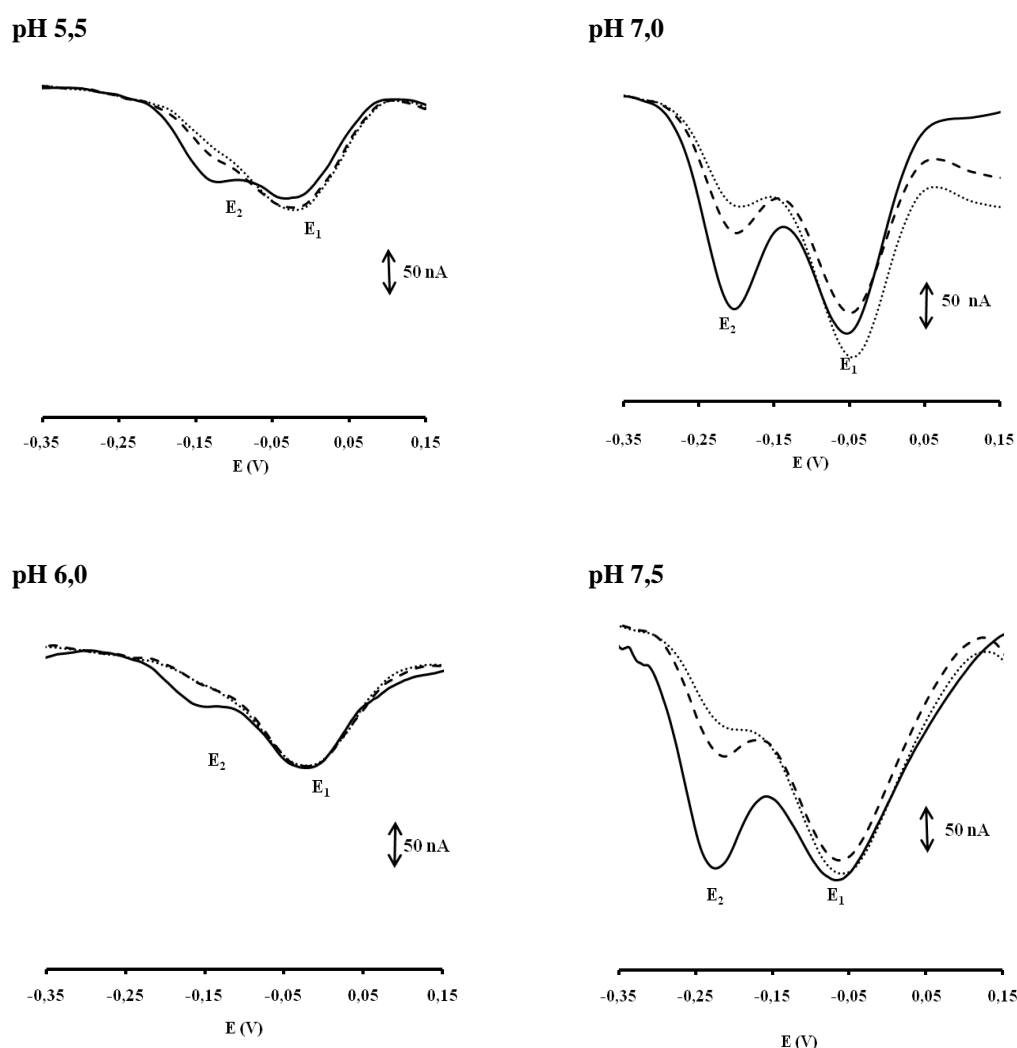


Figura 3.16 Voltamogramas de impulso diferencial consecutivos de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, (100 μ M), obtidos com um EGPF, a diferentes valores de pH. Primeiro (—), segundo (---) e terceiro (....) voltamograma consecutivos. Condições experimentais: tampão MES 10 mM (pH 5,5 e pH 6,0), tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 6,5), tampão HEPES 10 mM (pH 7,0 e pH 7,5) em presença de cloreto de cálcio 1 mM.

Foram escolhidos para este estudo os pH onde, por espectroscopia do visível, se tinha verificado a activação da PCc após redução da mesma com ascorbato de sódio.

Durante a redução da PCc são observados inicialmente dois sinais na zona catódica, com potenciais E_1 e E_2 , que variam com o pH (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 Potencial dos dois sinais observados nos voltamogramas de impulso diferencial de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em EGPF (primeiro varrimento).

pH	E ₁ (mV)	E ₂ (mV)
5,5	-18	-135
6,0	-36	-160
7,0	-50	-202
7,5	-67	-232

O sinal E₂ desaparece nos primeiros varrimentos de potencial, no entanto o sinal E₁ permanece bem definido. Este comportamento electroquímico verifica-se em todos os pH estudados. Como os processos que ocorrem são semelhantes, não se distinguindo o processo a pH 7,5 dos outros, como aconteceu nos estudos espectroscópicos de UV-visível, esse facto sugere que não estamos perante o processo de activação.

O pico E₁ (-67 mV a pH 7,5) não pode ser atribuído à forma pentacoordenada do hemo P, uma vez que a sua intensidade não aumenta com o tempo, isto é, não aumenta com o desaparecimento do sinal E₂ o que indica que são independentes. Este sinal poderá ter origem no outro hemo da PCc, o hemo E. Mas como se explica o potencial a que ocorre?

Para o entendimento destes resultados, dois dados revelam-se importantes:

- (i) a independência da presença de excesso de iões cálcio deste processo.
- (ii) o sinal E₁ permaneceu após a redução com ascorbato de sódio,

A activação da PCc nativa requer obrigatoriamente a presença de excesso de iões cálcio para que ocorra a pH 7,5, tal como se verificou por espectroscopia do visível e EPR. O facto dos resultados electroquímicos serem independentes da presença de excesso de iões cálcio indiciam que houve alterações estruturais na PCc que interage com a superfície do eléctrodo, uma vez que as soluções de trabalho são semelhantes nas várias técnicas utilizadas. Estas alterações tem como resultado a enzima ficar "insensível" à presença de excesso de iões cálcio. Por outro lado, o hemo E na forma nativa da PCc está coordenado axialmente a uma metionina e a uma histidina. O átomo de enxofre da metionina é um bom aceitador de electrões o que tem como resultado este hemo apresentar um potencial redox positivo, sendo facilmente reduzido por ascorbato de sódio. No hemo E, a ligação entre o ferro hémico e a metionina é fraca, podendo ser quebrada e o ferro ficar pentacoordenado. Com uma coordenação axial a uma histidina, o seu potencial de oxidação- redução poderá ser alterado ocorrendo a sua redução a potenciais mais baixos [231]. Esta hipótese foi confirmada por outros resultados electroquímicos uma vez que após adição de ascorbato de sódio e DAD, o sinal E₁ se mantém, o que mostra que o hemo E nestas condições não é reduzido pelo ascorbato, ocorrendo a sua redução a potenciais inferiores aos detectados nos ensaios potenciométricos. Assim sendo, propõe-se que o sinal E₁ seja atribuído à redução do hemo E, o que desencadeia a alteração de conformação da enzima e a libertação da metionina do hemo, passando este de hexacoordenado para pentacoordenado. Esta

forma alterada do hemo E apresenta um potencial redox mais baixo que o estado nativo (aproximadamente 290 mV), tal como foi reportado para a PCc de *Pa. pantotrophus* [245].

Hilbrandt e colaboradores têm-se debruçado sobre os efeitos de campo eléctrico, gerados nas proximidades da superfície de eléctrodos, na estrutura de proteínas hémicas [246- 252]. Nestes trabalhos verificaram que citocromos de tipo *c* sofrem distorções estruturais que levam na maior parte das vezes à perda do ligando distal metionina, quando sujeitos a campos eléctricos moderados. O campo eléctrico interfere nos mecanismos de transferência electrónica, condicionando a orientação das proteínas, bem como a sua aproximação e interacção com a superfície do eléctrodo [246- 252].

3.6.3 Catálise directa

i) Voltametria de impulso diferencial

O comportamento electroquímico da PCc na presença de peróxido de hidrogénio foi analisado por voltametria de impulso diferencial com eléctrodos EGPF. Verificou-se que a adição de peróxido de hidrogénio ao electrólito de suporte promove o aumento do sinal E_1 (Figura 3.17).

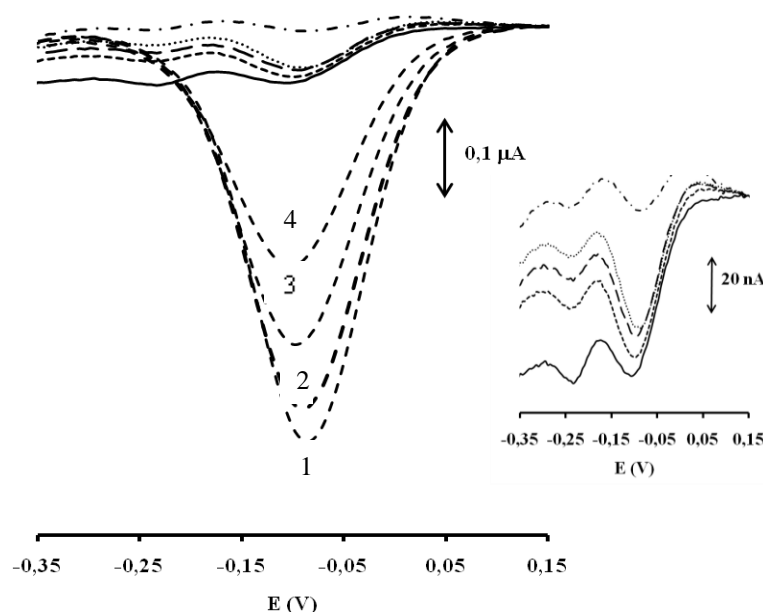


Figura 3.17 Voltamogramas de impulso diferencial de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 100 μM na ausência de peróxido (primeiro (—)), segundo (---), terceiro (— · —), quarto (·····) e o que antecedeu a adição de peróxido de hidrogénio(-----) e (---) os quatro primeiros voltamogramas consecutivos (1, 2, 3 e 4) após a adição de peróxido de hidrogénio 750 μM , obtidos usando um EGPF. Inserção: ampliação dos primeiros quatro voltamogramas consecutivos (primeiro (—), segundo (---), terceiro (— · —), quarto (·····) na ausência de peróxido de hidrogénio e do que antecedeu a adição de peróxido de hidrogénio (-----). Condições experimentais: electrólito de referência bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) com $CaCl_2$ 1 mM.

Pela observação dos voltamogramas da Figura 3.17, constata-se que a catálise ocorre num potencial próximo do sinal E_1 confirmando que este sinal deverá corresponder ao hemo E alterado.

Em estudos electroquímicos da redução de PCc de *Pa. pantotrophus* [245] e de PCc *Ps. stutzeri* [253] foram obtidos resultados semelhantes: a observação inicial de dois sinais catódicos a potenciais negativos, o desaparecimento do sinal mais negativo e a permanência do sinal mais positivo [245, 253]. Estas características foram atribuídas a modificações da forma nativa destas enzimas provocadas pela interacção com o campo eléctrico gerado nas proximidades do eléctrodo de grafite pirolítica, que teriam como consequência a alteração da estrutura da proteína, deixando esta de estar na forma nativa. Foi proposto que uma forma alterada das proteínas pode estar em equilíbrio com a forma nativa, coexistindo as duas. Verificou-se em estudos com PCc de *Pa. pantotrophus* [245] e de PCc *Ps. stutzeri* [253] que a forma alterada destas enzimas apresenta actividade catalítica não fisiológica a um potencial próximo do potencial do hemo P da forma fisiológica. Sinais electroquímicos anómalos (sinais mais negativos) de citocromos de tipo *c* com coordenação metionina-histidina foram encontrados por outros autores, apresentando estes citocromos actividade catalítica na presença de peróxido de hidrogénio [247, 252]. Este facto foi atribuído à ruptura da ligação entre a metionina e o ferro, o que origina um hemo pentacoordenado que poderá, assim, catalisar o peróxido de hidrogénio [157, 158].

ii) Voltametria cíclica

O comportamento electroquímico da PCc na presença de peróxido de hidrogénio foi também analisado por voltametria cíclica em eléctrodos EGPF, a diferentes valores de pH. Na Figura 3.18 apresenta-se os voltamogramas cíclicos na presença e na ausência de peróxido de hidrogénio a pH 7,5.

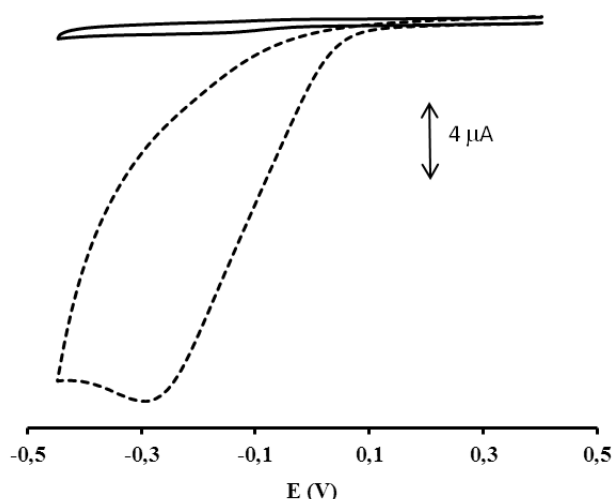


Figura 3.18 Voltamogramas cíclicos ($E_i = +0,400$ V, $E_{inv} = -0,450$ V, $E_f = +0,400$ V) a $v = 20$ mVs⁻¹ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 100 μ M na (—) ausência e (---) na presença de peróxido de hidrogénio 750 μ M, obtidos usando um EGPF. Condições experimentais: electrólito de referência bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) com CaCl₂ 1 mM.

Verifica-se que a PC*c* apresenta comportamento catalítico na presença de peróxido de hidrogénio em todos os valores de pH (dados não apresentados).

Da análise do voltamograma catalítico apresentado na Figura 3.18 é possível constatar que a resposta catalítica ao peróxido de hidrogénio é não fisiológica, uma vez que o potencial catalítico ($E_{cat} = -97$ mV), é semelhante ao potencial formal da PC*c* ($E_0' = -107 \pm 5$ mV) o que indica que é este hemo que está a catalisar a redução do peróxido de hidrogénio.

Estudou-se a dependência do potencial catalítico com o pH (Figura 3.19).

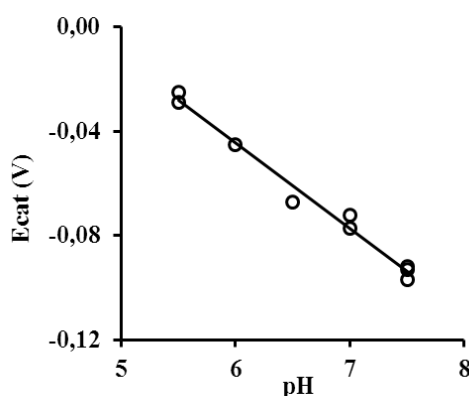


Figura. 3.19 Variação do potencial catalítico da catálise da PC*c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com o pH, determinada por voltametria cíclica usando EGPF ($E_{cat} = +0,152 - 0,033$ pH, $r = 0,99$).

A análise da variação do potencial catalítico com o pH revelou que o processo de redução da PC*c*, nestas condições envolve a transferência de dois electrões por cada protão ($E_{cat} = +152 - 33$ pH, $r = 0,99$). Como a dependência do potencial catalítico com o pH é menor do que a associada a um processo 1e:1p (59 mV/pH), isto sugere que estamos em presença de

acontecimentos adicionais associados à protonação, sendo propostos que, associado à transferência de um electrão ocorra o acoplamento de outro processo de protonação, tal como foi reportado para a PCc de *Ps. aeruginosa* [130]. Este resultado sugere que estamos em presença de PCc alterada.

Ocorrendo o processo de transferência electrónica por adsorção, utilizou-se a expressão $i_{\text{máx}} = nF\Delta\Gamma k_{\text{cat}}$, para determinar a constante catalítica (k_{cat}) nestas condições [241, 254]. Nesta expressão $nF\Delta\Gamma$ é a carga Q , que se determina pela área do pico do voltamograma a $v=20 \text{ ms}^{-1}$ sem H_2O_2 , e os restantes termos têm o significado usual.

Tabela 3.10 Variação da Constante catalítica com o pH

pH	$k_{\text{cat}} (\mu\text{s}^{-1})$
5,5	4,3
5,5	9,9
6,0	200,0
6,5	186,0
7,0	89,4
7,0	119,0
7,5	70,9
7,5	52,9

Verifica-se que nestas condições a corrente catalítica tal como a constante catalítica apresenta valor máximo para pH=6,0. Este resultado reforça a hipótese de se estar em presença de uma forma não nativa da enzima.

3.7 Estudos por voltametria de impulso diferencial utilizando eléctrodos de membrana de grafite pirolítica

Uma estratégia que se tem mostrado eficaz no estudo electroquímico de metaloproteínas é a utilização de eléctrodos de membrana, em que uma pequena quantidade (alguns microlitros) de solução de trabalho (solução contendo a proteína ou as proteínas em estudo) fica retida entre a superfície do eléctrodo e uma membrana de diálise [164, 171 e 211]. Em estudos electroquímicos de citocromos *c*, usando membranas carregadas negativamente foram examinados diferentes factores como o pré-tratamento da membrana [171], a carga da membrana, [171] os efeitos de espécies carregadas positivamente como a L-poli-lisina [171], a força iónica [171], o pH [171] e a espessura da camada de proteína junto à superfície do eléctrodo [171], tendo-se verificado que a resposta electroquímica nos eléctrodos de membrana é governada por interacções electrostáticas e que factores como a adsorção e a presença de formas desnaturadas não interferem com o sinal electroquímico [164, 171 e 211]. Eléctrodos de membrana foram já utilizados para o estudo electroquímico de alguns citocromos *c*,

nomeadamente do citocromo *c* de cavalo e do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* [164, 171].

Com o objectivo de mitigar o efeito do campo eléctrico, e dado que factores como a adsorção e a presença de formas desnaturadas mostraram não interferir com o sinal electroquímico das espécies em estudo [171 e 255], efectuaram-se também estudos electroquímicos em eléctrodos de membrana (EMGP), com voltametria de impulso diferencial. Nestes ensaios foram igualmente observados apenas dois sinais (E_1 e E_2), a potenciais negativos idênticos aos obtidos em EGPF (Figura 3.20).

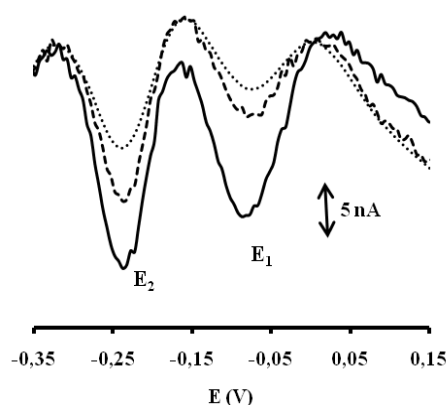


Figura 3.20 Voltamogramas de impulso diferencial consecutivos de PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (100 μ M), obtidos com um EMGP em HEPES 10 mM (pH 7,5). Primeiro (—), segundo (---) e terceiro (····) Condições experimentais: HEPES 10 mM (pH 7,5) em presença de CaCl_2 1 mM.

Observando os voltamogramas da Figura 3.20 é possível verificar que, neste caso o sinal E_2 é superior o E_1 , embora ocorra diminuição simultânea dos dois picos com o tempo. Este facto sugere que ambos os hemos (o hemo P hexacoordenado e o hemo E alterado) foram reduzidos, ficando a PCc numa forma reduzida e inactiva. O desaparecimento do sinal E_2 é mais lento do que quando se utiliza EGPF, ocorrendo simultaneamente com a diminuição do sinal E_1 . Ao fim de algum tempo os sinais electroquímicos são muito reduzidos. Este resultado pode ser explicado pelo facto de se utilizar um eléctrodo de membrana, cuja estrutura permite que após redução PCc esta migre para a solução diminuindo por isso ambos os sinais.

A utilização de eléctrodos de membrana também não permitiu o estudo da catálise directa, uma vez que os sinais encontrados são muito semelhantes aos anteriormente reportados e atribuídos a uma estrutura de PCc alterada.

3.8 Conclusão

Na presente investigação, a peroxidase do citocromo *c* foi isolada da bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* que foi cultivada em condições de microaerofilia na presença de nitrato de sódio com o aceitador de electrões alternativo ao oxigénio. A exposição desta bactéria a

oxigénio diminui significativamente a quantidade de PCc, que é sobreexpressa preferencialmente em condições de baixa tensão de oxigénio (condições de microaerofilia). Verificou-se nessas condições que o gene *ccp* poderá ser activado pelo regulador FNR envolvido na desnitrificação. Trabalhos de investigação desenvolvidos nos últimos anos com as bactérias *Sh. oneidensis* [79] e *Ge. sulfurreducens* [236] tem-se debruçado sobre este paradoxo confirmando que também essas PCc são sobreexpressas em condições de microaerofilia tal como a PCc de *Pa. pantotrophus* [97]. A oxidase terminal (quinol oxidase) de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, que reduz o oxigénio a peróxido de hidrogénio, poderá explicar a necessidade de condições de microaerofilia para a sobreexpressão de PCc, uma vez que ela reduz o dioxigénio a peróxido de hidrogénio [65, 200- 202], tal como acontece em *Pa. pantotrophus* [31]. A presença de peróxido de hidrogénio será sentida pelo regulador transcripcional FNR, que controla a expressão de vários genes, nomeadamente dos que codificam para proteínas envolvidas na via de desnitrificação como a reductase do nitrito, *cd₁*, e também do gene *ccp*.

O rendimento da purificação de peroxidase do citocromo *c* foi de 19%. A fracção pura de PCc apresentou uma razão de pureza de 4,6. A maior quantidade desta proteína no periplasma permitiu purificá-la com uma boa razão de pureza.

Neste trabalho verificou-se que em termos estruturais a PCc nativa é um dímero estável mesmo a elevada força iónica, pelo que deverá ser governada por forças hidrofóbicas, não dependendo a sua estrutura quaternária da presença de excesso de iões cálcio. De facto, pela análise de cristais da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, Dias e colaboradores propuseram que o dímero da PCc fosse estabilizado por interacções hidrofóbicas entre os domínio C-terminais dos dois monómeros e que a presença de ião cálcio na estrutura desencadeasse alterações conformacionais que contribuíssem para uma forte interacção entre os monómeros de PCc, sendo a área de superfície entre estes, maior na forma activa (3031 Å) (em que o ião cálcio está incorporado, pH 5,3) que na forma inactiva (2112 Å) (em que o cálcio não está incorporado na estrutura, pH 4,0) [71 e 97]. Nos estudos cristalográficos da PCc de *Pa. pantotrophus* também se obtiveram diferentes áreas de contacto entre as superfícies dos monómeros de PCc, sendo a área de superfície de contacto na forma oxidada ligeiramente inferior à área de superfície de contacto entre os monómeros de PCc na forma de valência mista [53].

O estudo da activação a pH 4,5 revelou que o hemo P se encontra em spin-baixo após a redução do hemo E, estando hexacoordenado; a adição de ião cálcio não altera o espectro do visível, não havendo activação a este valor de pH. Este facto reforça os resultados obtidos por cristalografia de Raios- X a pH 4,0, onde se verificou que ambos os hemos estão hexacoordenados e a estrutura não apresenta ião cálcio [71]. Verificou-se que as características

da banda de spin-alto (630 nm) a pH 4,5 são diferentes das encontradas para os restantes valores de pH estudados, o que reforça a hipótese de que a este valor de pH a estrutura não é a fisiológica. A pH entre 5,5 e 7,0 o processo de activação não depende da presença de excesso de iões cálcio, mas a sua presença acelera as alterações conformacionais, que deverão ser semelhantes às que ocorrem a pH 7,5. A necessidade de excesso de iões cálcio na activação da PCc a pH 7,5 foi comprovada, tal como tinha sido reportada anteriormente [71]. Estes dados são consistentes com o facto da estrutura da PCc obtida a pH 5,3, conter o ião cálcio e o hemo P se encontrar pentacoordenado [71, 97].

O mecanismo de activação tem características de um processo redox- Bohr, que consiste na dependência entre a redução do hemo E da PCc e a protonação de resíduos ionizáveis nos mesmos (grupos propionatos). Tendo em conta os resultados obtidos é possível inferir que a labilidade da ligação da metionina ao ferro do hemo E promoverá a redução do mesmo, desencadeando alterações conformacionais por protonação de um grupo próximo desse hemo (um dos grupos propionatos) e movimento das cadeias proteicas nas suas proximidades o que permitirá novas ligações, levando o hemo P a perder o ligando histidina distal (His 71) e a ficar penta-coordenado, dependendo este processo do pH [53, 97]. Verifica-se que a PCc, a pH 7,5, pode regular o estado de repouso (estado oxidado) e activo (estado de valência mista), podendo este ser um mecanismo protector caso não haja no meio electrões disponíveis. Assim a enzima evitaria a formação de radicais quando não interage com os parceiros fisiológicos.

A adição de cálcio à forma de valência mista da PCc promove alterações estruturais detectáveis no espectro de RPE: a PCc reduzida em presença de iões cálcio tem um espectro onde se constata que o hemo P se encontra em spin-baixo. Este facto poderá estar relacionado com a temperatura a que se adquiriu o espectro (8 K), a qual poderá ter facilitado a coordenação da molécula de água, permanecendo o hemo P em spin-baixo pentacoordenado. A água apesar de ser um ligando fraco, à baixa temperatura de aquisição (8K), promoverá uma ligação forte.

Em ¹H-RMN a adição de ião cálcio à PCc oxidada não originou grandes alterações no espectro, o que confirmou que a PCc purificada se apresentava dimérica e com algum cálcio incorporado. O espectro de valência mista foi semelhante aos de outras PCc nas mesmas condições.

O facto do dímero ser estável a pH 7,5 permitiu a determinação dos potenciais de oxidação e redução do hemo E e do hemo P em presença e na ausência de excesso de iões cálcio. Os potenciais formais determinados para os hemos E e P na ausência de excesso de iões cálcio foram +120 mV/+140 mV e -110 mV/-113 mV respectivamente. Na presença daquele ião os potenciais formais determinados para o hemo E e P foram +230 mV/+190 mV e -108 mV/-140 mV, respectivamente. A presença de iões cálcio estabiliza a estrutura da PCc, tal como foi anteriormente referido, facilitando a redução dos hemos e a alteração de

spin, ou seja a activação da enzima. O potencial do hemo E determinado com excesso de ião cálcio é próximo do potencial formal do citocromo c_{552} ($E_0' = 243 \pm 1$ mV), seu parceiro fisiológico, o que deverá facilitar a transferência de electrões entre ambos. Esta semelhança de potenciais ocorre entre outras PCc bacterianas e os parceiros fisiológicos [97]. O potencial redox do hemo E é ligeiramente mais elevado em presença de excesso de iões cálcio que na sua ausência, o que poderá estar relacionado com o processo de activação ocorrer quando estamos em presença de excesso de iões cálcio e não na sua ausência. Este resultado poderá significar que a estrutura cristalina conhecida a pH 5,3 poderá não ser a fisiológica activa, já que a alteração de potencial implica alteração ligeira do ambiente na vizinhança do hemo E, o que não se verificou neste cristal em comparação com o cristal obtido a 4,0 [71]. Uma alteração conformacional nas vizinhanças do hemo E, após este ser reduzido, foi reportada para PCc de *Pa. pantotrophus* [53], devendo também ocorrer nesta PCc. O hemo P mostrou ter um potencial redox pouco dependente da presença de ião cálcio indicando que a alteração de coordenação de hexa para penta poderá não influenciar muito ambiente em torno deste hemo. De referir ainda que embora a pH 7,5 seja necessário a redução do hemo E para a PCc activar, a redução do hemo E na ausência de excesso de iões cálcio não implica a activação da enzima.

Os resultados obtidos corroboram o mecanismo de activação apresentado no Capítulo 1| 1.2.10. Apresenta-se seguidamente o modelo de redução/oxidação proposto para a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* baseado nos resultados obtidos durante a titulação potenciométrica e nos estudos de espectroscopia do visível (Figura 3.21).

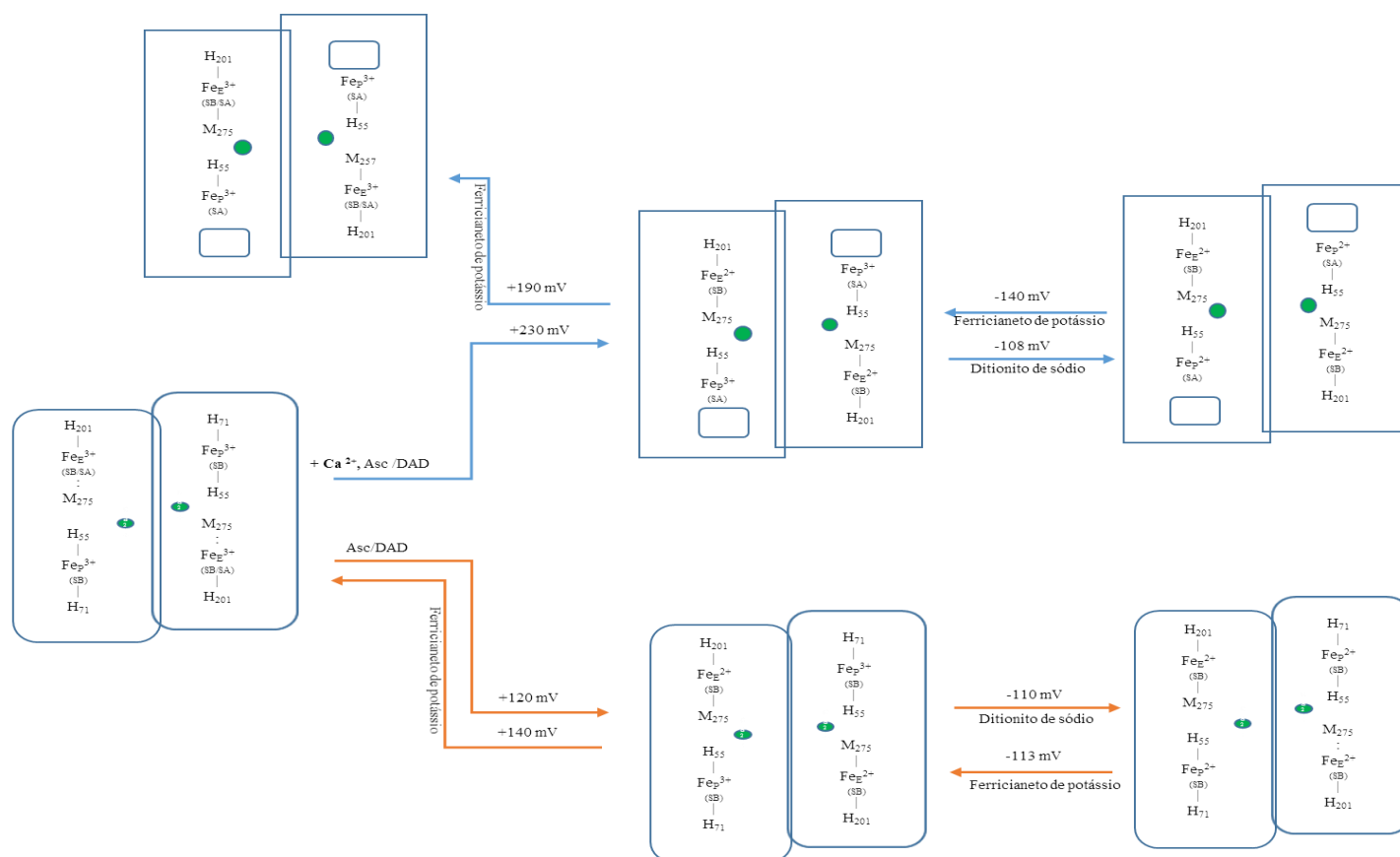


Figura 3.21 Modelo do mecanismo de redução/oxidação da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, pH 7,5.

Nos estudos electroquímicos, verificou-se que a interacção da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com a superfície do eléctrodo de GP desencadeia alterações estruturais na enzima tal como está reportado para outras PCc, ficando a enzima numa forma não nativa, onde o hemo E alterado (pentacoordenado) catalisa a redução do peróxido de hidrogénio. Em consequência deste facto não foi possível estudar a catálise directa e identificar possíveis intermediários usando métodos electroquímicos.

CAPÍTULO 4 | CATÁLISE DA PEROXIDASE DO CITOCROMO C
MEDIADA PELO CITOCROMO C₅₅₂ DE *MARINOBACTER*
HYDROCARBONOCLASTICUS

A catálise mediada entre a peroxidase do citocromo *c* e o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi estudada em condições de estado estacionário seguindo a redução do citocromo *c*₅₅₂ através de ensaios electroquímicos e espectrométricos. Pretendeu-se caracterizar a transferência intermolecular e o tipo de interacções entre parceiros fisiológicos.

4.1 Caracterização da cinética de transferência electrónica mediada por electroquímica

Os electrodos de membrana de grafite pirolítica (EGPM) tem sido utilizados para o estudo do comportamento electroquímico de citocromos *c* [164, 171], mas também da catálise da NiR mediada pelo o citocromo *c*₅₅₁ ou mediada pela azurina de *Ps. aeruginosa* [211], da catálise da PCc de *Pa. pantotrophus* mediada pelo o citocromo *c* de cavalo [255] e da catálise da PCc mediada pela pseudoazurina de *Pa. pantotrophus* [159].

A utilização neste trabalho de investigação de eléctrodos de membrana de grafite pirolítica em detrimento de eléctrodos de membrana de ouro, deve-se ao facto da GP apresentar uma carga superficial negativa a pH superiores a 5,6, não sendo necessário modificar a superfície do eléctrodo para se estudar proteínas com carga positiva, como o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (carga global +4 (pH 7,0)) ou o citocromo *c* de cavalo ((carga global +9 (pH 7,0)), nem usar promotores como o 4,4'-ditiodipiridina [159, 169, 255].

A teoria electroquímica que descreve processos de catálise mediada controlados por difusão foi aplicada em vários estudos cinéticos de reacções entre mediadores e enzimas [159, 167, 211 e 256]. Na catálise mediada o sinal electroquímico que se detecta é o sinal do mediador, que neste caso é o citocromo *c*₅₅₂, sendo por isso necessário em primeiro lugar analisar o seu comportamento electroquímico.

O comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂ foi analisado com um eléctrodo de grafite pirolítica com membrana (EGPM) por voltametria cíclica, usando uma membrana de diálise carregada negativamente. O eléctrodo de membrana foi preparado conforme se descreveu no Capítulo 2| 2.8.3, e seguidamente traçaram-se os voltamogramas cíclicos. O electrólito suporte continha cloreto de cálcio, uma vez que este terá que ser adicionado aquando do estudo da catálise mediada, de forma a promover a activação da PCc, como foi visto anteriormente no Capítulo 3| 3.3. Na Figura 4.1 apresentam-se os voltamogramas cíclicos correspondentes à resposta electroquímica do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em EMGP.

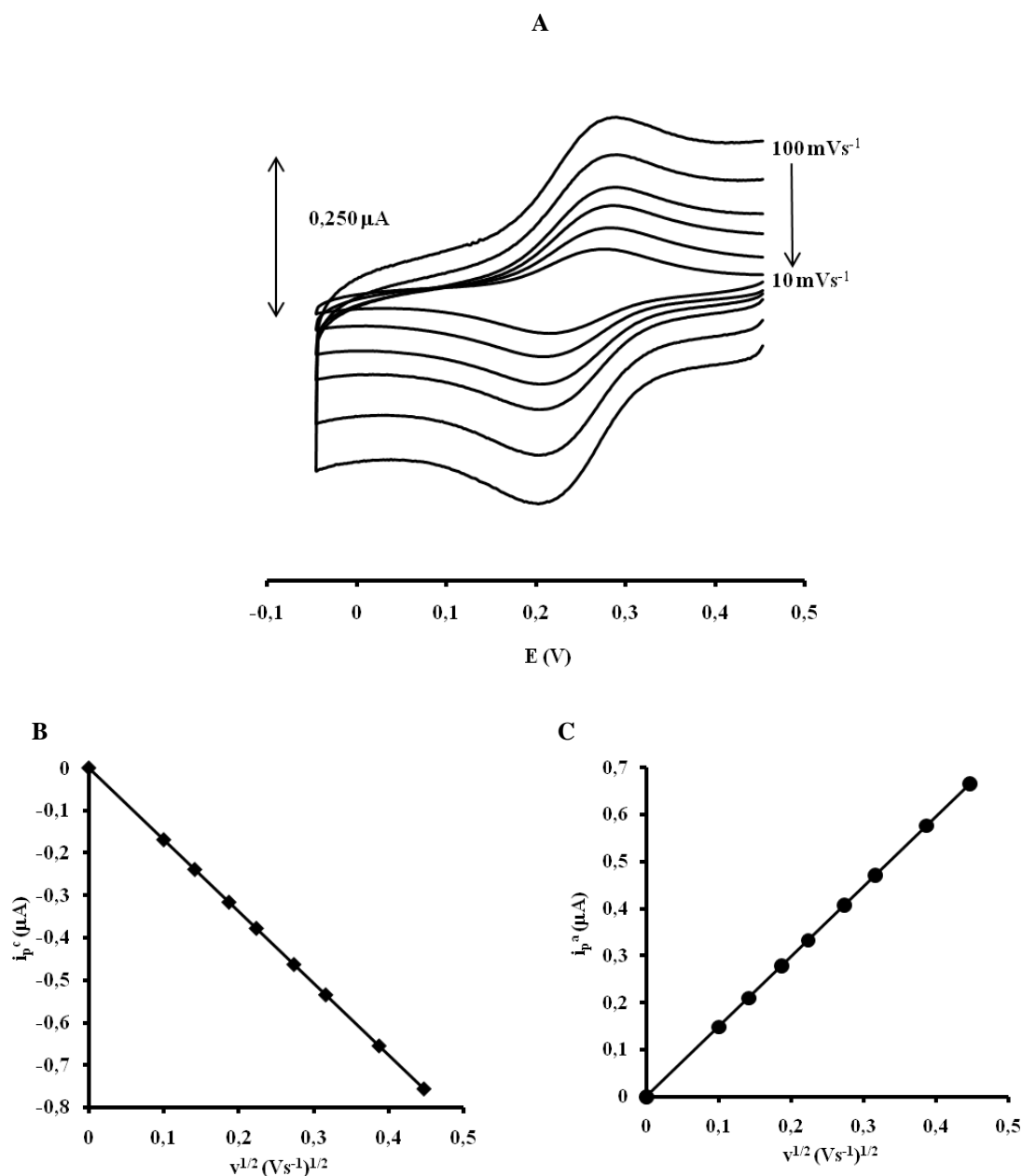


Figura. 4.1 (A) Voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento ($10 \leq v \leq 200 \text{ mVs}^{-1}$) do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a $35 \text{ } \mu\text{M}$, num EMGP. (B) Variação das correntes catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varrimento. (C) Variação das correntes anódicas com a raiz quadrada da velocidade de varrimento. Electrólito: bis-tris-propano 10 mM (pH 7,6) em presença de CaCl_2 1 mM . Equações das rectas: $i_p^c = -1,69 v^{1/2}$, $r = 0,99$, $i_p^a = 1,49 v^{1/2}$, $r = 0,99$.

A comunicação electroquímica directa entre o citocromo *c*₅₅₂ (com carga global positiva) e a superfície do eléctrodo de grafite pirolítica (carregada negativamente) é influenciada pelo ambiente eléctrico gerado pela membrana carregada negativamente, que não só o mantém próximo da superfície do eléctrodo como também o direcciona de forma a ocorrer a transferência de electrões entre a superfície e o citocromo.

Na Tabela 4.1 apresentam-se os parâmetros obtidos da análise dos voltamogramas cíclicos da Figura 4.1-A.

Tabela 4.1 Correntes catódicas (i_p^c) e anódicas (i_p^a), potenciais catódicos (E_p^c) e anódicos (E_p^a) e razão entre as correntes catódicas e anódicas (i_p^c/i_p^a), dos voltamogramas cíclicos do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, 35 μ M, num EMGP.

v (mVs ⁻¹)	E_p^c (V)	i_p^c (μ A)	E_p^a (V)	i_p^a (μ A)	$ i_p^c/i_p^a $
10	0,223	-0,17	0,270	0,17	1,04
20	0,215	-0,23	0,274	0,22	1,05
35	0,211	-0,30	0,276	0,27	1,09
50	0,208	-0,38	0,277	0,32	1,18
75	0,205	-0,45	0,278	0,40	1,14
100	0,204	-0,55	0,279	0,46	1,20
150	0,204	-0,66	0,279	0,58	1,14
200	0,204	-0,77	0,279	0,69	1,12

Verificou-se que, apesar de se utilizar um eléctrodo de membrana, o processo de transferência electrónica do citocromo *c*₅₅₂ em EMGP é controlado por difusão, uma vez que i_p varia linearmente com $v^{1/2}$, Figura 4.1-B e 4.1-C [241 - 243]. De facto os parâmetros que permitem determinar a reversibilidade de uma reacção de transferência electrónica em voltametria cíclica verificaram-se neste estudo (Tabela 4.1) sendo os seguintes:

- E_p é independente da velocidade de varrimento (275 ± 5 mV);
- $|i_{pa}/i_{pc}| = 1$ para qualquer velocidade de varrimento.

Os potenciais catódicos e anódicos não variaram com a velocidade de varrimento entre 35 mVs⁻¹ e 200 mVs⁻¹ (Tabela 4.1) e a razão entre as correntes catódicas e anódicas é unitária (Tabela 4.2), concluindo-se que a reacção de transferência de carga é reversível.

Tabela 4.2 Razão entre as correntes catódicas e anódicas (i_p^c/i_p^a), diferença de potenciais entre os potenciais catódicos e anódicos (ΔE_p) e média ($(E_p^c + E_p^a)/2$) dos voltamogramas cíclicos do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, 35 μ M, num EMGP para as diferentes velocidades de varrimento.

v (mVs ⁻¹)	ΔE_p (V)	$(E_p^c + E_p^a)/2$ (V)
10	0,047	0,247
20	0,059	0,245
35	0,065	0,244
50	0,069	0,243
75	0,073	0,242
100	0,075	0,242
150	0,075	0,242
200	0,075	0,242

Para velocidades de varrimento entre 35 mVs⁻¹ e 200 mVs⁻¹, a separação entre picos anódico e catódico ($\Delta E_p = E_p^a - E_p^c = 56/n$, em que o n é o número de electrões transferidos) permaneceu aproximadamente constante, $\Delta E_p = (64 \pm 7)$ mV, indicando que ocorre a transferência de um electrão durante a redução do citocromo *c*₅₅₂, uma vez que o sistema é reversível [242- 244].

O coeficiente de difusão, D , das espécies electroactivas (espécie reduzida, D_R , e espécie oxidada D_O) pode ser obtido a partir de dados voltamétricos, estando reportado para o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* um coeficiente de difusão de $(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ cm²s⁻¹ em Bis-Tris-propano 50 mM (pH 6,3), NaCl 100 mM [167] e de $1,1 \times 10^{-6}$ cm²s⁻¹ em tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) com NaNO₃ 100 mM e em presença de 4,4'-dipiridil 15 mM [164].

O valor do coeficiente de difusão do citocromo *c*₅₅₂ foi obtido experimentalmente a partir da variação da corrente de pico (i_p) com a raiz quadrada da velocidade de varrimento (Figura 4.1-B e C), sendo utilizada a equação de Randles-Sevcik (equação 2.19). O valor encontrado no presente trabalho de investigação foi de $(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ cm²s⁻¹ em Bis-Tris-propano 10 mM (pH 7,6), CaCl₂ 1mM.

Sendo os declives das rectas i_p em função de $v^{1/2}$ próximos (Figura 4.1-B e C), considera-se que o coeficiente de difusão da espécie oxidada é semelhante ao coeficiente de difusão da espécie reduzida. Nestas circunstâncias, o potencial de meia onda, $E_{1/2} = E^{0'} + RT/nF \ln D_R/D_O$, obtido através da média $E_{1/2} = (E_p^c + E_p^a) / 2$, no caso de um sistema reversível, corresponde ao potencial formal $E^{0'}$. A constância da média dos potenciais catódico e anódico, $(E_p^c + E_p^a)/2$ (Tabela 4.2), permitiu determinar o potencial formal de redução, $E^{0'}$, como sendo (243 ± 1) mV. Este valor está de acordo com o reportado por Correia dos Santos e colaboradores +244 mV (pH 7,6, 10 mM Tris-HCl) [164].

O potencial redox de um citocromo *c* resulta de várias contribuições como exposição do ferro hémico ao solvente, o ambiente electrostático, hidrofóbico e empacotamento do mesmo, ligações hidrogénio entre o hemo e os resíduos da cadeia proteica, bem como da geometria dos ligandos axiais [158, 164, 169 e 170]. No citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a coordenação hémica Met-Fe-His será a responsável pelo potencial (243 ± 1) mV a que o hemo é reduzido, uma vez que a metionina axial é um bom aceitador de electrões o que facilita a redução do ferro hémico, ocorrendo esta a potenciais altos [227].

Estudou-se o transporte de massa em soluções mais concentradas de citocromo *c*₅₅₂ (71 µM e 141 µM) fazendo variar a velocidade de varrimento (Figura 4.2).

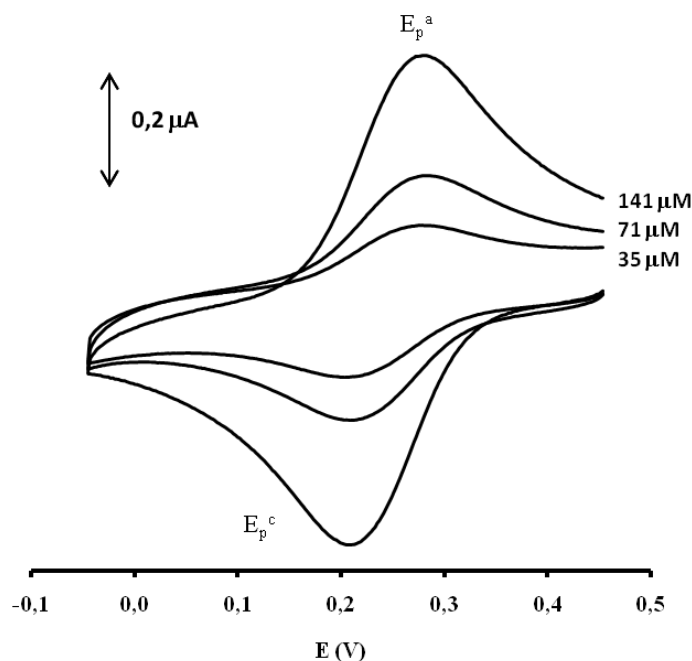


Figura 4.2 Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) de diferentes concentrações de citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* num EMGP. Condições experimentais: bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) em presença de CaCl_2 1 mM.

Aumentando a concentração de citocromo *c*₅₅₂ aumenta a corrente voltamétrica para a mesma velocidade de varrimento. Pela análise dos resultados obtidos (dados não apresentados), verificou-se que o comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂ não varia com a concentração, tendo-se escolhido para o estudo da catálise mediada a concentração mais baixa (35 μM), de modo a minimizar a quantidade de citocromo *c*₅₅₂ utilizada em cada ensaio.

Estudou-se o comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂ após a adição de peróxido de hidrogénio (dados não apresentados), verificando-se que o mesmo não sofre qualquer alteração. Estes ensaios tiveram como objectivo verificar se o peróxido de hidrogénio teria interferência no sinal do citocromo *c*₅₅₂, uma vez que este será utilizado como mediador no estudo da catálise mediada da PCc.

O efeito do pH no potencial formal desta metaloproteína foi analisado entre os valores de pH 4,5 e 11,0. A ausência de sinal do citocromo *c*₅₅₂ abaixo de 4,5 e acima de 11,0 estabeleceu estes limites (Figura 4.3).

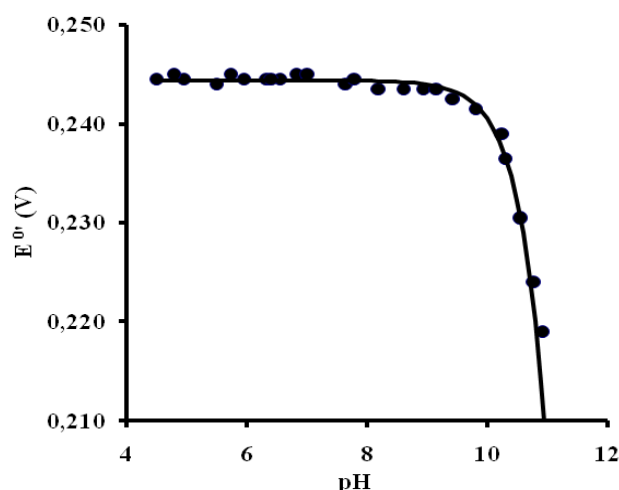


Figura 4.3 Variação do potencial formal, E^0 , do citocromo *c*₅₅₂ com o pH, a força iónica constante. Condições experimentais: determinação por voltametria cíclica (20 mVs⁻¹) usando um EMGP com citocromo *c*₅₅₂ 35 µM. O ajuste efectuou-se utilizando a equação 4.2 e um algoritmo do programa *Excel* (Solver), obtendo-se um valor de pK_a de $10,7 \pm 0,1$.

A variação de pH não alterou a forma do voltamograma na gama de valores de pH estudados. A pH inferior a 4,5 não se observou resposta; este resultado tinha sido já reportado por Lopes e colaboradores, tendo estes atribuído esta ausência à formação de uma forma de citocromo *c*₅₅₂ não reactiva [167]. A partir de pH 11,0 não se observou resposta electroquímica do citocromo *c*₅₅₂, tal como reportado por Paes de Sousa e colaboradores [164, 167]. A diminuição e ausência de resposta electroquímica a valores de pH 10,0 e superiores a 11,0, respectivamente, foram atribuídas à carga negativa deste citocromo (pI 7) e da superfície do eléctrodo, de que resulta a repulsão entre ambos e diminuição da sua interacção [167, 170] e à desnaturação do citocromo que ocorre a $pH \geq 11,5$, observada por espectroscopia de ¹H-RMN [164, 165, 167].

O citocromo *c*₅₅₂ apresenta uma dependência de pH do potencial formal, definida por um valor de pK_a de $10,7 \pm 0,1$ (Figura 4.3, equação 4.2).

$$E_m = E^0 - 0,059 \log \frac{[H^+] + K_a}{[H^+]} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

O valor de pK_a referido na literatura para este citocromo, também determinado por técnicas electroquímicas, é 10,6 [164, 165 e 169], o qual é semelhante ao valor obtido neste estudo. Este pK_a alcalino está de acordo com resultados reportados para citocromos *c* semelhantes a este, sendo atribuído à saída da metionina ligada ao hemo e que apresenta um pK_a de 10,9 (o pK_a da metionina é 9,3) [164- 167 e 169]. A passagem para um meio alcalino provoca a desprotonação da histidina e o enfraquecimento da ligação metionina-ferro, o que origina a saída deste aminoácido [169].

Em seguida estudou-se a influência da variação da força iónica do electrólito, na redução do citocromo *c*₅₅₂ (Figura 4.4).

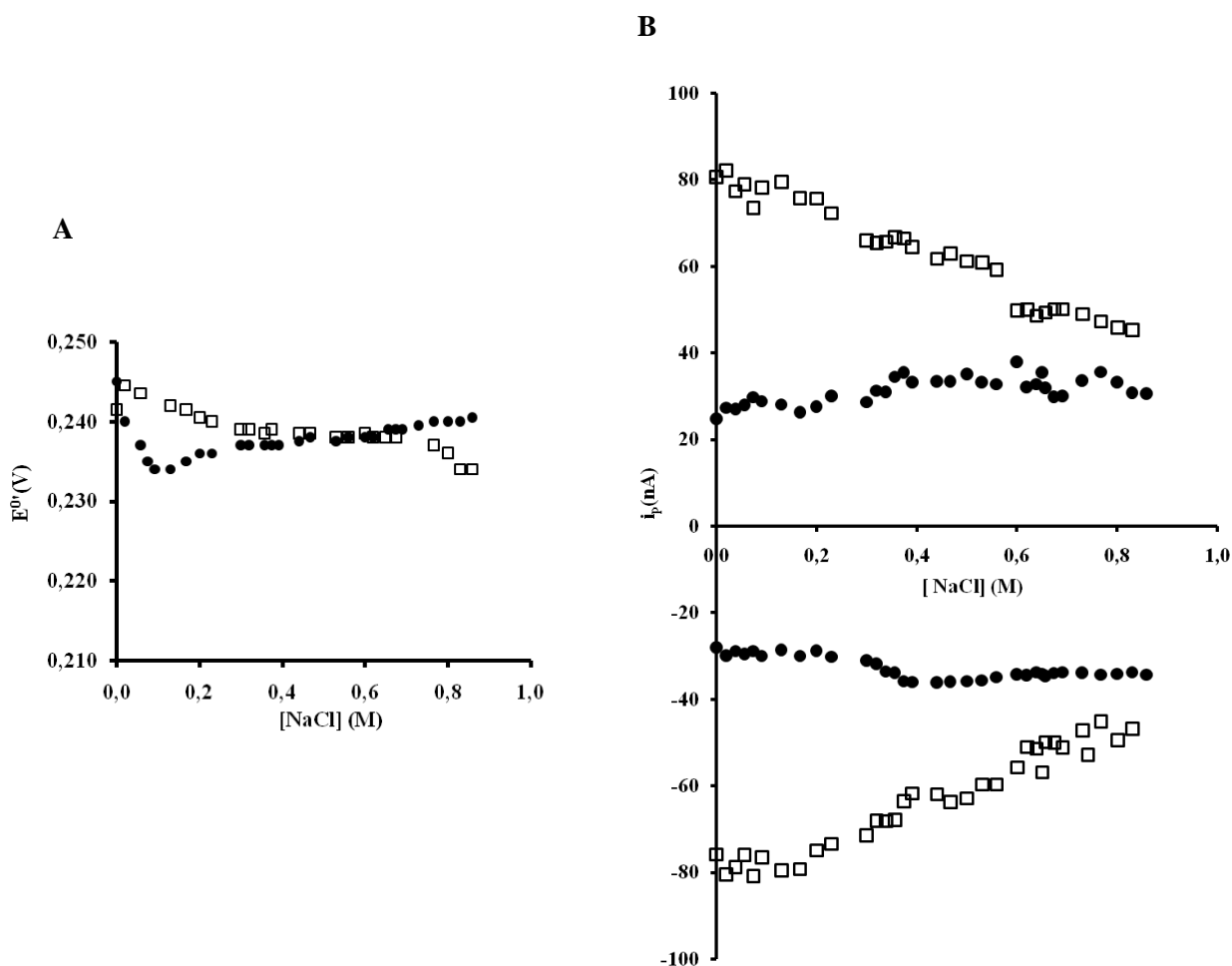


Figura 4.4 (A) Variação do potencial formal e (B) das correntes do pico anódico e catódico com a força iónica, dos voltamogramas cíclicos do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 35 μ M, num EMGP. Electrólito: bis-tris-propano 10 mM a pH 6,5 (\square) e a pH 7,5 (\bullet) na presença de CaCl_2 1 mM.

A análise da Figura 4.4 mostra que o potencial formal não varia, dentro do erro do método (± 10 mV), com a força iónica, a pH 6,5 e a pH 7,5. As correntes catódicas e anódicas diminuíram com o aumento da força iónica a pH 6,5 (decréscimo de 35 nA) (Figura 4.4-B), mas mantiveram-se praticamente constantes a pH 7,5 (Figura 4.4- B).

A diminuição da intensidade das correntes a pH 6,5 pode ser atribuída à diminuição da interacção entre o citocromo *c*₅₅₂ e a superfície do eléctrodo. A grafite pirolítica (GP) (pH 6,5) tal como a membrana encontra-se carregada negativamente, já o citocromo *c*₅₅₂ tem uma carga global positiva, pelo que a interacção entre ambos será de carácter electrostático. Assim sendo, o aumento da força iónica provoca uma diminuição desta interacção, pelo que se observa a diminuição da intensidade da corrente dos voltamogramas.

A pH 7,5 o citocromo *c*₅₅₂ (ponto isoléctrico de 7,0) apresenta-se, tal como a membrana e a GP, carregado negativamente, pelo que se espera que a interacção seja menor. De facto, verifica-se que as correntes dos sinais catódicos e anódicos a pH 7,5 são inferiores às medidas a pH 6,5. No entanto, e visto que as correntes de pico se mantêm, pode-se concluir que embora a interacção seja menos favorável (as correntes catódicas e anódicas são de facto menores) o aumento da força iónica tem um efeito menos prenunciado. Foi proposto por Correia dos Santos e colaboradores que, num eléctrodo de membrana de grafite o factor mais importante para o processo de transferência de electrões entre o citocromo *c*₅₅₂ e a superfície do eléctrodo a pH 7,6, não fosse as interacções electrostáticas, mas as ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos C-O da superfície do eléctrodo de grafite e provavelmente os resíduos lisina do citocromo *c*₅₅₂ [169]. De facto, a lisina apresenta uma cadeia lateral polar, tendo esta um grupo guanidino fortemente básico que poderá interagir com os grupos CO da superfície da grafite.

4.2 Caracterização da interacção entre a peroxidase do citocromo *c* e o citocromo *c*₅₅₂ de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

As transferências electrónicas entre parceiros fisiológicos podem ser influenciadas por vários factores, como a diferença de potencial de redução [257], as propriedades electrostáticas das proteínas [185, 194], a distância entre centros redox [182, 258], a orientação e a dinâmica molecular [182, 191, 258], os quais contribuem para o controlo da velocidade de transferência de electrões entre parceiros [178, 180, 197, 205, 235].

Seguidamente apresenta-se o estudo da transferência intermolecular de electrões durante a catálise da PC*c* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, onde serão analisados alguns destes factores.

4.2.1 Efeito da presença de peroxidase do citocromo *c* no sinal do citocromo *c*₅₅₂

A função do citocromo *c*₅₂₂ como doador de electrões da PC*c* foi estudada usando um EMGP.

Com o objectivo de determinar se a presença da PC*c* altera a resposta electroquímica do citocromo *c*₅₅₂ a pH 7,5, traçaram-se voltamogramas a diferentes velocidades de varrimento, para uma solução de trabalho em que a proporção entre o citocromo *c*₅₅₂ e a PC*c* era 7:1 e analisou-se o comportamento do citocromo *c*₅₅₂.

Verificou-se que o comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂ não é afectado pela presença de PC*c*, sendo o processo de transferência electrónica controlado por difusão (*i*_p varia linearmente com $v^{1/2}$) [244], sem que surjam outros fenómenos como a adsorção

(declive da recta $\log i_p$ versus $\log v$ aproximadamente 0,5 entre 10 mV e 200 mV) (dados não apresentados) [240, 241]. Para velocidades de varrimento entre 10 mVs⁻¹ e 100 mVs⁻¹, a separação entre picos, $E_{pa}-E_{pc}$, permaneceu aproximadamente constante $\Delta E_p = (60 \pm 5)$ mV, indicando que ocorre a transferência de um electrão ($n=1$) durante a redução do citocromo *c*₅₅₂, já que $\Delta E_p = E_p^a - E_p^c = 56/n$, sendo n o número de electrões transferido [242 - 244]. O potencial formal, E° , determinado nestas condições foi de (243 ± 1) mV, sendo este valor igual ao obtido na ausência de PCc.

Analisou-se o efeito do pH entre 4,5 e 11,0 (Figura 4.5-A), tendo-se observado um perfil de potencial formal em tudo idêntico ao obtido para o citocromo *c*₅₅₂ sozinho ($pK_a = (10,7 \pm 0,1)$) (Figura 4.4-A), tendo-se estimado um pK_a idêntico ao anteriormente obtido $(10,8 \pm 0,1)$.

Estudou-se também o comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂ na presença de PCc variando a força iónica do electrólito (Figura 4.5-B). O potencial formal do citocromo *c*₅₅₂ não variou com a força iónica (dentro do erro do método, ± 10 mV), ocorrendo uma variação das correntes dos sinais catódicos e anódicos, semelhante à anteriormente apresentada na ausência de PCc (dados não apresentados).

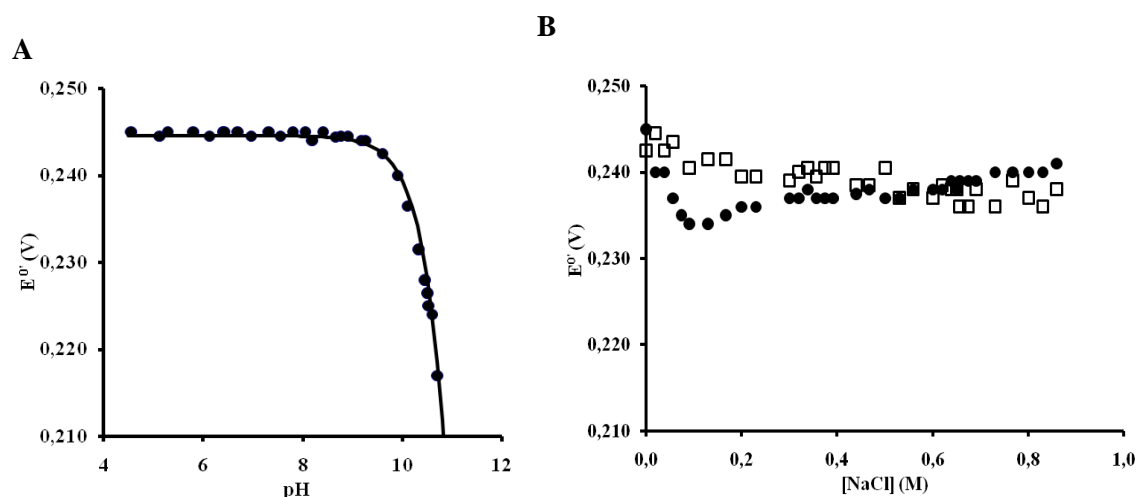


Figura 4.5 (A) Variação do Variação do potencial formal com o pH e (B) e com a força iónica a pH 6,5 (□) e a pH 7,5 (●) dos voltamogramas cíclicos do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* 35 μ M, num EMGP. Electrólito: bis-tris-propano 10 mM em presença de PCc 4,6 μ M, CaCl₂ 1 mM. O perfil da variação do potencial com o pH foi simulado usando a equação 4.2 e um pK_a de $10,8 \pm 0,1$.

A presença de PCc na solução trabalho não modifica a resposta electroquímica do citocromo *c*₅₅₂ a pH 7,5, nas condições que irão ser utilizadas para estudar a catálise da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂.

4.2.2 Catálise da peroxidase do citocromo *c* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂

Para se investigar a catálise mediada por métodos voltamétricos, o sistema em estudo deverá obedecer às seguintes condições [159, 167, 171, 211, 234, 255]:

- 1 A transferência electrónica heterogénea (entre o mediador e a superfície do eléctrodo) é uma reacção reversível;
- 2 A presença de enzima não interfere com o comportamento reversível do mediador;
- 3 A reacção química homogénea - mediador/enzima - é irreversível (em condições saturantes);
- 4 A reacção entre o mediador e a enzima é de pseudo-primeira ordem, $v = k' [\text{Mediador}]$, $k' = k [\text{enzima}]$.

O esquema da catálise de PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ apresenta-se na Figura 4.6.

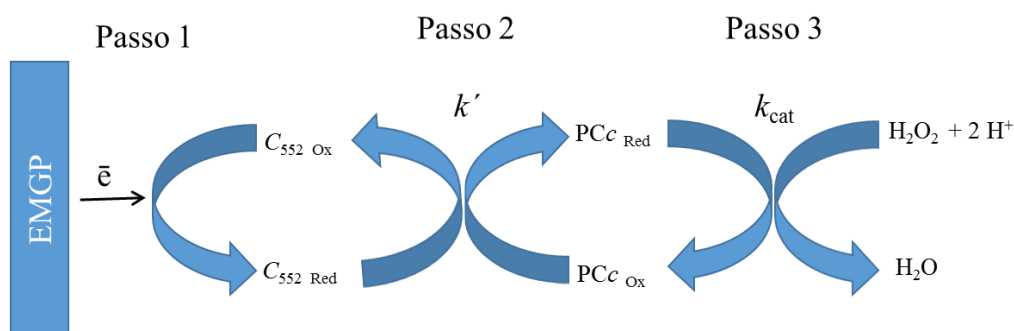


Figura 4.6 Esquema da catálise peroxidase do citocromo *c* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*: O eléctrodo reduz o citocromo *c*₅₅₂ (passo 1) que é rapidamente reoxidado pela enzima (passo2) a qual é regenerada pela conversão do peróxido de hidrogénio a água (passo3). Adaptado da referência 169.

A primeira condição foi verificada na secção anterior (Capítulo 4| 4.1), tal como a segunda (Capítulo 4| 4.2.1). Durante a catálise mediada o citocromo *c*₅₅₂ é reduzido junto da superfície do eléctrodo, sendo reoxidado pela enzima (PCc). A utilização de peróxido de hidrogénio em excesso permite a reoxidação da PCc através do ciclo catalítico e não a transferência de electrões novamente para o citocromo *c*₅₅₂. Assim, o passo 2 (Figura 4.6) pode ser considerado irreversível e a terceira condição cumprida. A quarta condição implica que a enzima esteja em largo excesso. Nas condições utilizadas neste estudo, embora a enzima não esteja em excesso relativamente ao mediador, devido à presença de peróxido de hidrogénio em concentrações saturantes este requisito é obedecido desde que a velocidade da catálise não seja um factor limitante na regeneração da PCc oxidada por redução de H_2O_2 . Neste caso, a enzima

estará sempre disponível para reagir com o citocromo *c*₅₅₂ e as condições de reacção de pseudo-primeira ordem serão cumpridas.

No mecanismo catalítico, a transferência de carga mediada entre a enzima e o eléctrodo pode ser quantificada. Se o processo de transferência de carga é controlado por difusão, como se verificou para o citocromo *c*₅₅₂, verificam-se as seguintes relações matemáticas (equação 4.3 e equação 4.4):

$$i_p = 0,4463 (nF)^{3/2} (RT)^{-1/2} A [\text{Mediador}] (D_{\text{Med}})^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$i_{\text{cat}} = n F A [\text{Mediador}] (D_{\text{Med}} k')^{1/2} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

onde i_p é a corrente do sinal do mediador (a diferentes velocidades) na ausência de substrato e i_{cat} é a corrente catalítica, ou seja, a corrente na presença de substrato em excesso.

Deste modo, é possível determinar a constante de primeira ordem, k' , a partir da relação (i_{cat}/i_p) em função de $(1/v)^{1/2}$ (equação 4.5) e determinar k (equação 4.6).

$$(i_{\text{cat}}/i_p) = 2,241 (RT/nF)^{1/2} k'^{1/2} (1/v)^{1/2} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

$$k' = k [\text{enzima}] \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Se a catálise mediada apresentar uma cinética de Michaelis-Menten, verifica-se a relação apresentada pela equação 4.7

$$i_{\text{cat}} = \frac{i_{\text{máx}} [S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

onde K_M é a constante de Michaelis-Menten e a corrente catalítica máxima é obtida pela relação expressa na equação 4.8

$$i_{\text{cat máximo}} = nFA C_{\text{med}} D_{\text{med}}^{1/2} k'^{1/2} \quad (\text{Eq 4.8})$$

onde n é o número de electrões, F a constante de Faraday, A a área do eléctrodo, C_{med} a concentração do mediador e D_{med} o coeficiente de difusão do mediador. A constante de pseudo-primeira ordem, k' , pode assim ser determinada a partir da curva de Michaelis-Menten.

Tendo em conta que o processo é controlado por difusão, a equação 4.7 pode ser escrita como (equação 4.9):

$$i_{\text{cat}} = \frac{nFA(C_{\text{Med}} k')^{1/2} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

Num estudo preliminar analisou-se a constância do sinal catalítico ao longo do tempo, (Figura 4.7).

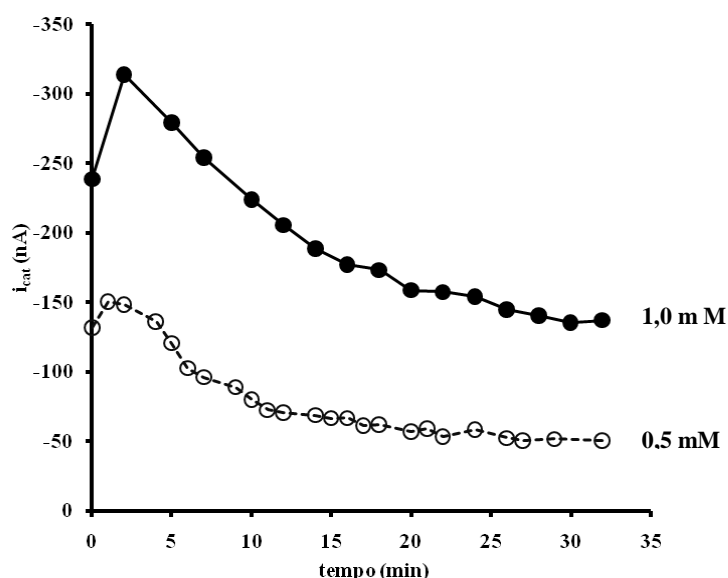


Figura 4.7 Variação das correntes catalíticas ao longo do tempo após adição de 0,5 mM (○) ou 1,0 mM (●) de peróxido de hidrogénio utilizando EMGP. Correntes catalíticas obtidas nas seguintes condições: voltamogramas cíclicos a 20 mV s^{-1} de citocromo *c*₅₅₂ 35 μM , peroxidase do citocromo *c* 4,6 μM , em bis-tris-propano 10 mM (pH =7,5) e CaCl_2 1 mM.

A variação das correntes catalíticas em função do tempo apresenta a forma de sino, com um máximo no segundo varrimento após adição de peróxido de hidrogénio. A constante de inactivação estimada pelo melhor ajuste para uma reacção de primeira ordem foi de $-0,38 \text{ nA/min}$ ($i_{cat} = 0,19e^{-0,38t}$) e $-0,27 \text{ nA/min}$ ($i_{cat} = 0,28e^{-0,27t}$) para uma concentração de peróxido de hidrogénio 0,5 mM e 1,0 mM respectivamente. No final destes ensaios adicionou-se novamente peróxido de hidrogénio, não tendo havido aumento das correntes catalíticas; o voltamograma era idêntico ao obtido na ausência de peróxido de hidrogénio.

As correntes catalíticas do segundo varrimento são maiores do que as do primeiro varrimento, consequência de inicialmente a PC*c* estar oxidada, e de necessitar que o hemo E seja reduzido, para que em presença de iões cálcio fique activa. Assim, adoptou-se como critério para a recolha de dados, o segundo voltamograma após a adição de peróxido de hidrogénio.

Verifica-se também que mesmo após a homogeneização da solução, ou seja após o segundo voltamograma, o sinal diminui. Esta redução poderá ser consequência da diminuição de actividade da enzima ao longo do tempo, resultado da interacção com o peróxido de hidrogénio. Vários estudos demonstraram que as hemoproteínas, incluindo peroxidases, são inactivadas na presença de concentrações catalíticas de peróxido de hidrogénio [156, 157]. Um comportamento semelhante foi reportado, por Dequaire e colaboradores para a catálise de peroxidase do citocromo *c*, onde também se verificou a diminuição das correntes catalíticas com o tempo, tendo atribuído esse facto à formação de uma oxiperoxidase inactiva resultado da

reação entre o peróxido de hidrogénio e a enzima [158]. Esta oxiperoxidase é convertida espontaneamente por decomposição na forma inicial da enzima e em ião superóxido. A diminuição da actividade catalítica durante a catálise medida da PCc de *Pa. pantotrophus* pela pseudoazurina da mesma bactéria, foi também reportada, tendo os autores atribuído este facto à inactivação da PCc por parte do peróxido de hidrogénio [159].

O facto da adição de peróxido no final destes ensaios não promover a catálise (dados não apresentados) sugere que a PCc fica numa forma não activa, que já não consegue catalisar o peróxido de hidrogénio.

O efeito da concentração de peróxido de hidrogénio na catálise mediada foi estudado, usando EMGP, tendo-se variado a concentração de peróxido de hidrogénio entre 0 e 2 mM.

Inicialmente o sistema reversível apresenta dois picos o catódico e o anódico. Após a adição de peróxido de hidrogénio, a corrente catódica aumenta enquanto o voltamograma se torna irreversível. Para valores de peróxido de hidrogénio mais elevados os picos catódico e anódico desaparecem e a onda toma a forma sigmoidal (Figura 4.8).

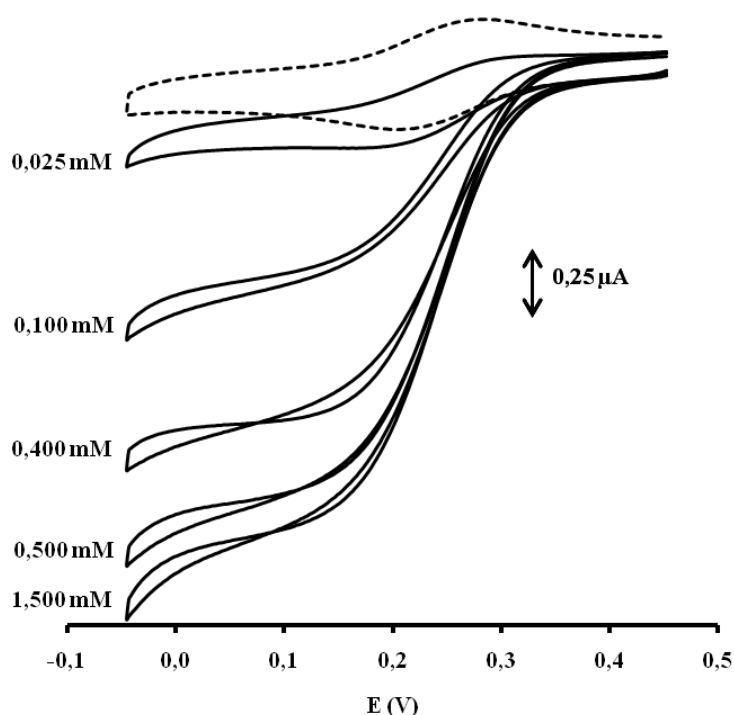


Figura 4.8 Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) da catálise da peroxidase do citocromo *c* $4,6 \text{ } \mu\text{M}$ mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ $35 \text{ } \mu\text{M}$ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, usando um EMGP, em bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5) e CaCl_2 1 mM , na ausência (----) e na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (—).

Verifica-se que, para concentrações de peróxido de hidrogénio iguais e superiores a 0,400 mM, o aumento da intensidade das correntes catalíticas com o tempo continua no varrimento inverso seguido de cruzamento do traçado anódico no catódico, antes e depois do potencial de redução do citocromo *c*₅₅₂ ($E^{0'} = 243 \pm 1$ mV) (Figura 4.8). Também é possível observar a histerese nesses voltamogramas catalíticos (Figura 4.8).

Resultados semelhantes foram obtidos por Dequaire no estudo electroquímico da catálise mediada da peroxidase de cavalo [158]. Estes investigadores interpretaram a histerese encontrada nos voltamogramas e o cruzamento do traçado anódico no catódico como a consequência de dois factores: por um lado seriam consequência do aumento do tempo requerido para a enzima alcançar um hipotético estado estacionário o que explicaria a histerese, por outro, o facto das condições de cinética pura serem cada vez menos cumpridas com o aumento das velocidades de varrimento. Este último facto significaria que, com o aumento da velocidade de varrimento, a difusão do mediador controlaria cada vez mais a dinâmica do sistema.

Os resultados obtidos neste trabalho foram interpretados com base no trabalho publicado por Dequaire [158]: a histerese observada nos voltamogramas (Figura 4.8) estará relacionada com o tempo que é necessário para que a enzima (PCc) alcance o estado estacionário e o cruzamento do traçado catódico pelo anódico será consequência do afastamento das condições de cinética pura o que significa que a difusão do citocromo *c*₅₅₂ controla a dinâmica do sistema. Estes fenómenos são difíceis de observar em separado, uma vez que a diminuição das velocidades de varrimento permitem alcançar as condições de cinética pura, mas requer mais tempo para se alcançar um estado estacionário o que poderá favorecer a inactivação da PCc. De qualquer modo continuam-se a cumprir as condições que o sistema em estudo deverá obedecer para que se possa estudar a catálise mediada por métodos voltamétricos, enunciadas anteriormente.

Como se pode observar na Figura 4.8, as curvas catalíticas obtidas apresentam uma forma sigmoideal típica de uma catálise, verificando-se que as correntes catalíticas aumentam com a concentração de peróxido de hidrogénio até um valor de 0,5 mM, a partir do qual se mantêm aproximadamente constantes (Figura 4.9).

O potencial catalítico, $E_{cat} = 248 \pm 5$ mV, determinado directamente da curva catalítica utilizando o software GPES, é semelhante ao valor do potencial formal da reacção de oxidação e redução do citocromo *c*₅₅₂, o que confirma que este processo é devido à redução daquele citocromo na superfície do eléctrodo. Este comportamento é consistente com um mecanismo catalítico, $E_rC'_i$, que se inicia com uma reacção de transferência de carga heterogénea entre a superfície do eléctrodo e o citocromo *c*₅₅₂ (Passo 1, Figura 4.6), seguida por uma reacção

química homogénea, onde o citocromo *c*₅₅₂ é regenerado pela PCc (Passo 2, Figura 4.6), que por sua vez é reciclada pelo peróxido de hidrogénio (Passo 3, Figura 4.6) [167, 244].

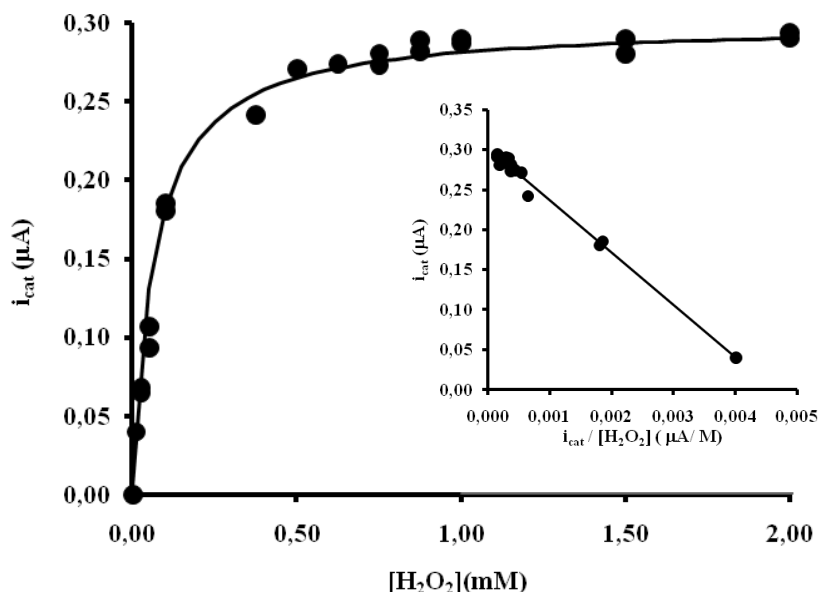


Figura 4.9 Variação da corrente catalítica com a concentração de peróxido de hidrogénio, a partir dos voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) obtidos com EMGP. Os pontos foram ajustados a uma cinética de Michaelis-Menten. A solução de trabalho continha citocromo *c*₅₅₂ 35 μM , PCc 4,6 μM e CaCl_2 1 mM, em tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7,5). Inserção: linearização de Eadie-Hofstee dos valores da corrente catalítica em função da razão entre a corrente catalítica e a concentração de peróxido de hidrogénio. Cinética de Michaelis – Menten, ajustada com $K_M = (65 \pm 2) \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = i_{\text{cat Max}} = (302 \pm 2) \text{ nA}$ (valores obtidos pela linearização de Eadie-Hofstee (Capítulo 2| 2.8.5)).

A catálise apresenta uma cinética típica de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos determinados para o peróxido de hidrogénio foram: $K_M = (65 \pm 2) \mu\text{M}$ e $V_{\text{máx}} = i_{\text{catmáx}} = (302 \pm 2) \text{ nA}$ (parâmetros usados no ajuste da curva (Figura 4.9), obtidos da linearização Eadie–Hofstee da curva de Michaelis–Menten (inserção na Figura 4.9)).

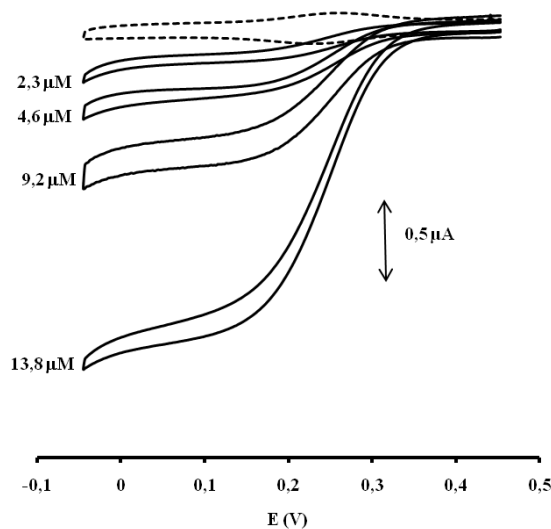
O valor da constante de Michaelis-Menten obtida neste trabalho é diferente do determinado pelo mesmo método para a enzima PCc de *Ps. stutzeri* ($1,8 \pm 0,05 \mu\text{M}$) [58], de *Mc. capsulatus* ($0,51 \pm 0,1 \mu\text{M}$, para o citocromo *c*₅₅₅ ou $3,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para o citocromo *c*₅₅₃) [69], de *Ps. aeruginosa* (6,0 μM) e de *Pa. pantotrophus* (390 μM) [159] mas próxima do estimado para *Rb. capsulatus* (40 μM) [67]. Esta diferença reflecte a especificidade de cada enzima e da sua interacção com o mediador da catálise.

No entanto, quando o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é o doador de electrões da reductase do óxido nitroso (N₂OR) do mesmo organismo, a constante de Michaelis-Menten obtida por espectroscopia do visível é de $50,2 \pm 9,0 \mu\text{M}$ (pH 7,6, Tris-HCl 0,1 M) [166], sendo da mesma ordem de grandeza da constante obtida no presente trabalho de investigação, o que poderá indicar que, ela será uma característica do doador de electrões.

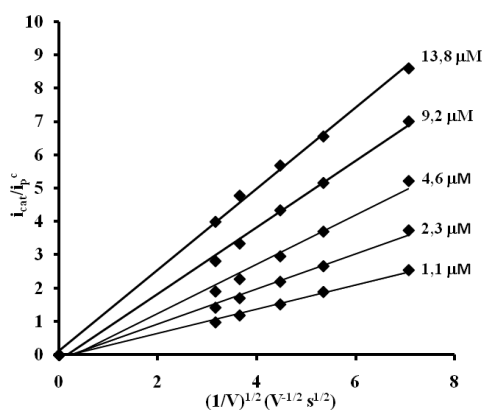
Estimou-se a constante de pseudo-primeira ordem, k' , a partir da curva de Michaelis-Menten; o valor de $i_{\text{cat máx}}$ foi de $302 \pm 2 \text{ nA}$, e calculou-se um k' de $1,9 \text{ s}^{-1}$. A partir deste valor estimou-se um valor para a constante intermolecular, k , pela expressão $k' = k [\text{PCc}]$ [159, 167]. Tendo em conta que a concentração de PCc usada foi de $4,6 \mu\text{M}$, o valor estimado de k foi de $4,1 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A constante intermolecular também pode ser determinada através da variação da concentração de peroxidase do citocromo *c*, utilizando uma concentração de citocromo *c*₅₅₂ constante e de peróxido de hidrogénio saturante. Neste caso, observou-se que o processo de transferência de carga durante a catálise mediada foi controlado por difusão (i_p variou com $v^{1/2}$), sendo possível determinar, nas condições experimentais, uma constante de velocidade de transferência electrónica intermolecular. Verifica-se que nestas condições, as correntes catalíticas aumentaram com o aumento da concentração de PCc para qualquer concentração de PCc (Figura 4.10-C), apresentando as curvas catalíticas forma sigmoidal (Figura 4.10-A).

A



B



C

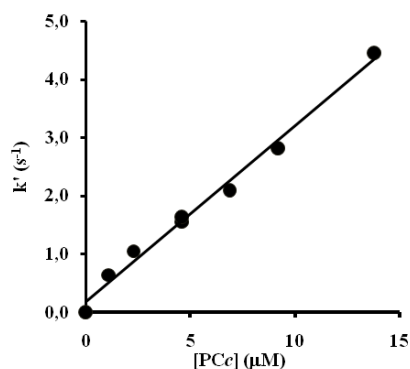


Figura 4.10 (A) Voltamogramas cíclicos ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) em tampão bis-tris-propano, 10 mM (pH 7,5), obtidos com EMGP. Condições experimentais: citocromo *c*₅₅₂ 35 μM , CaCl_2 1 mM, peróxido de hidrogénio 1 mM e peroxidase do citocromo *c* em diferentes concentrações. (B) i_{cat}/i_p^c em função de $(1/v)^{1/2}$ e (C) variação da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (k') com a concentração de PCc. Equação da recta: $k' = 0,43 [\text{PCc}] + 1,77$ com $r = 0,991$. A constante de pseudo-primeira ordem, (k') foi obtida a partir do declive das rectas de (i_{cat}/i_p^c) em função de $(1/v)^{1/2}$ (equação 4.5).

A constante de velocidade de transferência intermolecular foi estimada a partir da variação de k' com a concentração de peroxidase do citocromo *c* (Figura 4.10-C), tendo-se estimado o valor de $(4,3 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Comparando os valores da constante intermolecular obtidos, por electroquímica, para a catálise da PCc de *Pa. pantotrophus* mediada pela pseudoazurina $((1,6 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ [159], para a catálise da PCc de *Ps. stutzeri* mediada pelo citocromo *c*₅₅₁ $((5,7 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ [58] e o valor obtido neste trabalho para a catálise da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ $((4,3 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$, podemos verificar que estes são todos da mesma ordem de grandeza.

O citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é o doador electrónico da PCc mas também da reductase do nitrito (citocromo *cd*₁) e da reductase do óxido nitroso (N₂OR) do mesmo organismo. A constante de transferência electrónica intermolecular entre a reductase do nitrito, determinada por electroquímica em presença de 100 mM de NaCl é de $(4,1 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 6,3 [167]. Isto evidencia que a transferência electrónica entre o citocromo *c*₅₅₂ e os diferentes parceiros ocorre com a mesma velocidade, sendo independente do parceiro.

4.2.3 Efeito do pH na catálise mediada

O efeito do pH nas correntes catalíticas foi analisado entre pH 5,0 e 11,0 uma vez que o sinal do citocromo *c*₅₅₂ só é detectado nesse intervalo. Em todos os pH estudados, o processo de transferência de carga foi reversível e ocorreu por difusão (dados não apresentados).

Na Figura 4.11 apresentam-se os pontos experimentais, que têm um perfil em forma de sino, à qual foi ajustada uma linha de tendência, usando a equação 2.18 apresentada no Capítulo 2| 2.9, $(i_{\text{cat}} = i_{\text{máx}} / (1 + 10^{(\text{pK}_{\text{a1}} - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a2}})})$ [227].

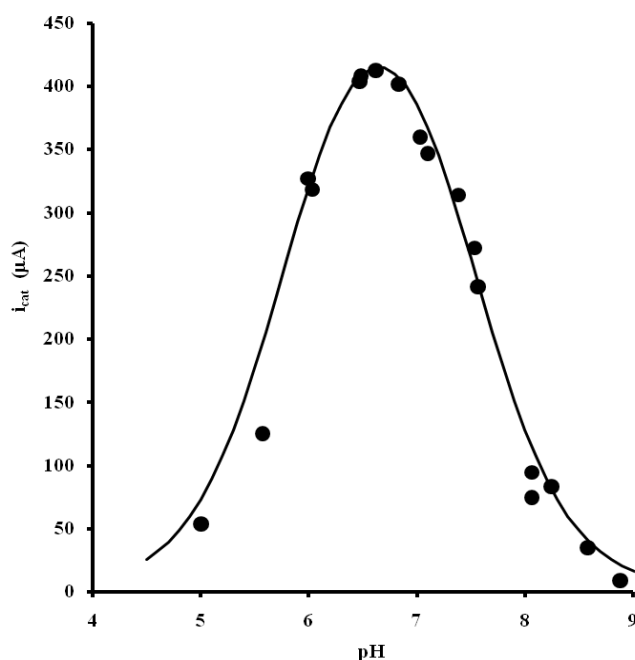


Figura 4.11 Variação da corrente catalítica, i_{cat} , com o pH. Ensaio com EMGP, com uma solução de trabalho de citocromo *c*₅₅₂ 35 μM e peroxidase do citocromo *c* 4,6 μM, em presença de CaCl₂ 1 mM, peróxido de hidrogénio 1 mM. Soluções tampão utilizadas 10 mM: acetato (pH 5,0), MES (5,5 < pH < 6,5), HEPES (7,0 < pH < 7,5), bis- tris-propano (8,0 < pH < 8,5) e CAPS (pH 8,9). O ajuste da curva efectuou-se utilizando a equação (2.18) e um algoritmo do programa *Excel* (Solver) permitiu estimar os $pK_{a1} = 5,8 \pm 0,1$ e $pK_{a2} = 7,5 \pm 0,1$.

O melhor ajuste usando a equação 2.18, foi conseguido utilizando o pK_{a1} de $5,8 \pm 0,1$ e o pK_{a2} de $7,5 \pm 0,1$, ocorrendo a actividade catalítica máxima ao valor de pH de 6,6 (Figura 4.11).

A forma da curva da variação da actividade enzimática com o pH é semelhante à reportada para a catálise mediada da PCc de *Ps. aeruginosa* (com um pH ótimo de 6,0 e pK_s de 5,2 e 6,8 [42, 44, 211]), da PCc de *Rb. capsulatus* (pH ótimo 7,0 e pK_s de 6,1 e 7,9 [67]) e da PCc de *Pa. pantotrophus* (pH ótimo 6,5 e pK_s de $5,6 \pm 0,1$ e $7,5 \pm 0,1$ [159]).

A dependência do pH da interacção PCc-citocromo *c*₅₅₂, reflecte um processo de dissociação de protões, e envolve um grupo com um pK_a próximo de 5,8 o que sugere que corresponda à desprotonação de um grupo propionato do hemo E. Este grupo poderá fazer par iónico com a histidina 261 da cadeia proteica ou a histidina ligada ao ferro hémico (histidina 71) sendo esta última responsável pelo pK_{a2} [53, 67, 97, 227]. A interacção do grupo propionato com as histidinas hémicas ocorre por pontes de hidrogénio. O protão libertado durante o processo de desprotonação do propionato poderá estar envolvido numa ligação por pontes de hidrogénio, o que afectará o pK_a da histidina que apresenta por isso valor superior ao seu pK_a (pK_a (imidazole) = 6,0, pH 7,0) [256]. Poderá também acontecer desprotonação da histidina o que implicará um reforço na ligação com o hidrogénio do grupo carboxílico de um propionato

ligado ao hemo E, o que poderá também promover o aumento do valor do pK_a [53, 227, 256, 259 e 260], não sendo possível no entanto, apenas com estes dados confirmar estas hipóteses.

De referir que o que domina a transferência de electrões é a interacção entre o citocromo *c*₅₅₂ e a peroxidase do citocromo *c*, o que condiciona os valores de pK encontrados. A pH inferior a 5,5 e superior a 8, verificou-se por espectroscopia de UV-visível (Capítulo 3| 3.3) que a quantidade de enzima activa é reduzida mesmo em presença de cloreto de cálcio. As correntes catalíticas detectadas a esses valores de pH (Figura 4.11) dever-se-ão ao facto da solução de trabalho utilizada na membrana ser preparada a pH 7,5 estando nestas condições alguma enzima activada.

O ambiente marinho onde a PC_c vive (Golfo de Fos) tem um pH próximo de 8 [261]. Se os resultados aqui reportados ocorressem *in vivo*, a actividade enzimática era baixa, havendo provavelmente inibição da enzima por excesso de peróxido presente no meio. Esta diminuição acentuada de actividade catalítica entre pH 7,0 e pH 8,0 também foi encontrada para a catálise da NiR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ e estudada pela metodologia do presente trabalho de investigação [167]. Tal como foi sugerido por Lopes e colaboradores [167], para a catálise da NiR medida pelo citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, duas hipóteses se poderão colocar, ou o periplasma apresenta um pH diferente do meio ambiente exterior, próximo do pH óptimo e mais compatível com a actividade enzimática ou a regulação alostérica ocorre através da interacção proteína-proteína. De referir que o pH óptimo da catálise da NiR mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é 6,3 e o da catálise de PC_c mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ também de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é de 6,6, e que, para valores de pH superiores a 7,3 a catálise da NiR mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ é praticamente nula [167]. Em qualquer das situações, o comportamento *in vitro* detectado na catálise da PC_c mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ ou a catálise da NiR mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ poderá ser diferente do *in vivo*, podendo estes resultados não corresponder a uma realidade fisiológica.

4.2.4 Efeito da força iónica na catálise mediada

O efeito da força iónica na constante de transferência intermolecular foi analisado a pH 6,5 e 7,5. A escolha destes pH está relacionada com os resultados obtidos por espectroscopia de visível (Capítulo 3| 3.3) em que se verificou que a pH 6,5 a activação da PC_c é independente da presença de excesso de iões cálcio.

4.2.4.1 Diferente metodologia para a preparação da solução de trabalho

A influência da força iónica na catálise foi estudada alterando a força iónica tanto no electrólito como na solução de trabalho (condição 1) e alterando a força iónica apenas no

electrólito (condição 2). Na Tabela 4.3 apresentam-se as correntes catalíticas e as constantes de pseudo-primeira ordem para a catálise mediada a pH 6,5 a diferentes forças iónicas. Na Figura 4.12 apresenta-se o perfil da variação da actividade catalítica com a força iónica.

Tabela 4.3 Variação das correntes catalíticas e de k' com a força iónica na catálise mediada a pH 6,5.

Condição 1: Solução de trabalho e electrólito com a mesma força iónica			Condição 2: Solução de trabalho e electrólito inicialmente com forças iónicas diferentes	
[NaCl] (M)	i_{cat} (μA)	k' (s^{-1})	i_{cat} (μA)	k' (s^{-1})
0,00	406	1,85	412	1,88
0,05	437	1,99	581	2,65
0,10	255	1,16	261	1,19
0,20	188	0,86	161	0,74
0,30	130	0,56	118	0,54
0,40	95,0	0,43	97,9	0,45
0,50	62,1	0,28	135	0,62
0,60	12,3	0,27	118	0,54
0,70	5,27	0,12	120	0,55
0,80	7,00	0,13	118	0,49

$$i_{cat} = nFk'ACD, \text{ sendo } A = 0,062 \text{ cm}^2, [\text{citocromo } c_{552}] = 35 \mu M, D_{med}^{1/2} = 1,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

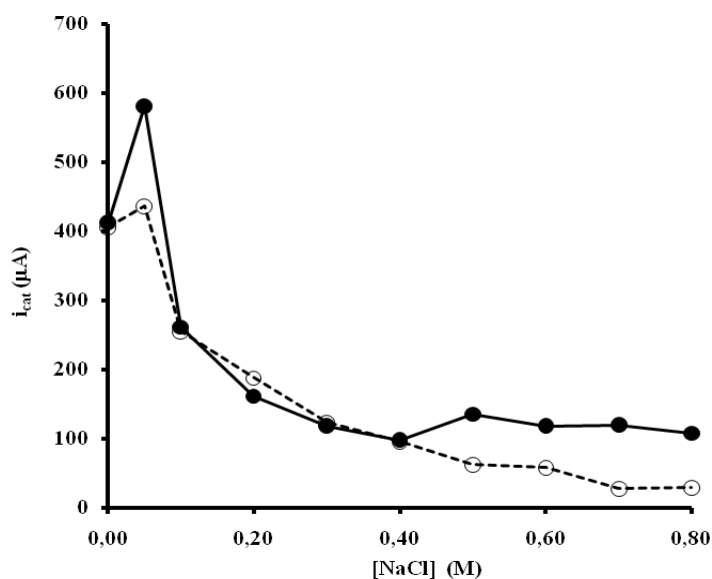


Figura 4.12 Variação das correntes catalíticas com a força iónica. (●) Condição 1 (a solução de trabalho e o electrólito têm a mesma força iónica) e (○) Condição 2 (a solução de trabalho e o electrólito tem diferente força iónica). Condições experimentais: voltametria cíclica ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) em solução de bis-tris-propano, 10 mM (pH 6,5) com peroxidase do citocromo *c* 4,6 μM , citocromo *c*₅₅₂ 35 μM , CaCl_2 1mM e peróxido de hidrogénio 1 mM.

Verifica-se, pelos resultados apresentados na Figura 4.12, que a catálise da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ é dependente da força iónica, sendo o perfil da catálise muito semelhante nos dois casos (forma de sino). Em ambas as situações há um máximo de actividade

que ocorre a 50 mM de cloreto de sódio (2,8 ppm), havendo depois uma diminuição das correntes catalíticas que, é mais acentuada quando a força iónica é igual no electrólito e na solução de trabalho.

Comparando os valores das correntes catalíticas na ausência e na presença de cloreto de sódio (a 0 e 800 mM), quando a solução de trabalho tem força iónica diferente do electrólito (condição 1), verifica-se um decréscimo de actividade catalítica de aproximadamente 73%. Quando o electrólito e a solução de trabalho têm inicialmente a mesma força iónica, isto é quando a força iónica é ajustada no electrólito de suporte, o decréscimo é de aproximadamente 98% (condição 2).

Quando a aproximação entre parceiros ocorre num ambiente com elevada carga electrostática (condição 2), o complexo que se forma não favorece a transferência de electrões entre parceiros, levando a menores correntes catalíticas. Quando a formação do complexo ocorre a força iónica baixa (condição 1) e depois se coloca este a uma força iónica ligeiramente superior (50 mM), verifica-se um aumento da catálise podendo estimar-se uma constante intermolecular, *k*, de $5,8 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor, superior ao encontrado quando a catálise ocorre a baixa força iónica, indica que provavelmente a força iónica conferiu mobilidade dentro do complexo de modo a possibilitar um atracamento molecular do citocromo *c*₅₅₂ mais favorável à transferência de electrões. Com o aumento da força iónica (acima de 50 mM) o complexo fica menos estável, diminuindo a actividade catalítica. De realçar que para esta diminuição também contribui uma menor interacção entre o citocromo *c*₅₅₂ e a superfície do eléctrodo, provavelmente consequência da proximidade da membrana carregada negativamente e de ambos (citocromo *c*₅₅₂ e superfície do electrodo) estarem carregados negativamente. As interacções entre a superfície do eléctrodo de GP e o citocromo *c*₅₅₂ a este pH são governadas por forças electrostáticas (Capítulo 4| 4.1), sendo então também esta, uma das causas da diminuição observada nesta experiência.

A variação da força iónica na catálise da NiR mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* também foi estudada através de métodos electroquímicos a pH 6,3, verificando-se que o aumento da força iónica promove o aumento da catálise enzimática. O valor máximo da mesma ocorre para uma força iónica de I=180 mM, permanecendo constante na gama estudada (I~0 a I=300 mM) [167]. Ao contrário da curva de actividade catalítica da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ que diminui com o aumento da força iónica, a curva da actividade catalítica da NiR mediada pelo mesmo citocromo sugere que ocorreu o efeito de blindagem com o aumento da força iónica. Isto é, as interacções entre o citocromo *c*₅₅₂ e a NiR tornaram-se mais favoráveis uma vez que os iões cloreto e sódio se ligam a resíduos carregados diminuindo assim o carácter electrostático das superfícies de ambas as proteínas, o que favorece uma interacção com a superfície do eléctrodo de ouro governada por forças hidrofóbicas [167].

Este resultado é concordante com o facto da *Ma. hydrocarbonoclasticus* ser uma bactéria marinha que vive a uma força iónica elevada (~ 35 ppm).

4.2.4.2 Efeito da força iónica na catálise a diferentes valores de pH

Estudou-se o efeito da força iónica na catálise da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ do mesmo organismo, a pH 6,5 e 7,5. Pretendeu-se verificar em que medida a força iónica influenciará a catálise em diferentes valores de pH. Seguidamente apresentam-se os resultados dos vários ensaios (Figura 4.13, Tabela 4.4) para pH 7,5.

Tabela 4.4 Potenciais catalíticos, formal, constante intramolecular (*k'*) e correntes catalíticas obtidas no estudo do efeito da força iónica na catálise mediada entre a PCc e citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* a pH 7,5.

[NaCl](M)	E ⁰ (mV)	E _{cat} (mV)	i _{cat} (μA)	k' (s ⁻¹)
0	244	248	438	1,98
0,03	244	250	430	1,96
0,04	244	247	487	2,22
0,05	244	245	401	1,83
0,06	245	250	434	1,98
0,10	245	246	638	2,91
0,20	245	245	430	1,96
0,30	245	245	320	1,46
0,50	245	248	36,2	0,16
0,80	243	245	42,6	0,19

(*k'* = declive i_{cat}/i_p^c vs (1/v)^{1/2})

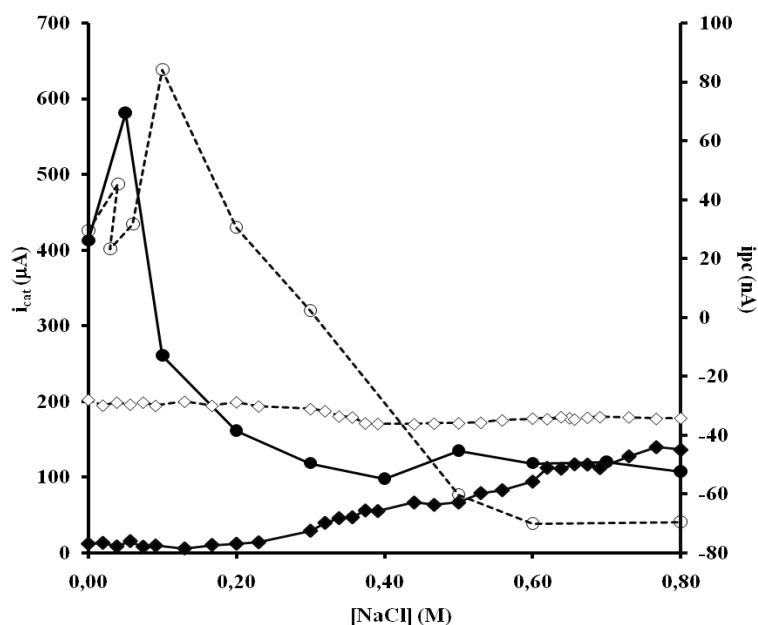


Figura 4.13 Variação da corrente catalítica, *i*_{cat}, com a força iónica a pH 6,5 (●) e a pH 7,5 (○) e dependência das correntes de pico, *i*_p^c para a redução do citocromo *c*₅₅₂ a pH 6,5 (◆) e a pH 7,5 (◇), determinadas por voltametria cíclica (*v* = 20 mVs⁻¹) com EMGP. Condições experimentais para a catálise mediada: citocromo *c*₅₅₂ 35 μM e peroxidase do citocromo *c* 4,6 μM, CaCl₂ 1 mM em tampão bis-tris-propano 10 mM e peróxido de hidrogénio 1 mM. A variação da força iónica efectuou-se pela adição de pequenos volumes de solução de NaCl 6 M ao electrólito. Condições experimentais para a redução do citocromo *c*₅₅₂ 35 μM: bis-tris-propano 10 mM, na presença de CaCl₂ 1 mM.

As curvas das correntes catalíticas em função da concentração de cloreto de sódio, têm um perfil semelhante (a forma de sino), com um máximo a 50 mM ($k = (5,8 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a 100 mM ($k = (6,3 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a pH 6,5 e 7,5 respectivamente (Figura 4.13). Após estas concentrações de NaCl, ocorre uma diminuição da actividade catalítica, mais acentuada a pH 6,5 que a pH 7,5.

Comparando os valores da corrente catalítica na ausência e na presença de cloreto de sódio (800 mM), verifica-se que há um decréscimo de actividade de aproximadamente 73%, a pH 6,5, sendo este decréscimo a pH 7,5 de cerca de 84 %. No entanto a pH 7,5, a corrente catalítica é superior à obtida a pH 6,5 entre 100 mM e aproximadamente 450 mM.

A constância dos potenciais formais a pH 7,5 e a 6,5 (dados não apresentados) mostra que a natureza da interacção do citocromo *c*₅₅₂ com o eléctrodo não é alterada pela variação da força iónica.

Na presença e na ausência de PCc a pH 6,5, o aumento da força iónica originou uma diminuição da intensidade da corrente, estando este facto relacionado com a diminuição da interacção entre o citocromo *c*₅₅₂ e a superfície do eléctrodo, que é predominantemente electrostática (Figura 4.3). A presença de PCc não influencia a orientação do citocromo *c*₅₅₂ na superfície do eléctrodo, uma vez que a presença de PCc não altera o comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂. Para concentrações de cloreto de sódio inferiores a 50 mM, a membrana, que tal como o eléctrodo de grafite pirolítica tem carregada negativa, promove não só uma boa orientação do citocromo *c*₅₅₂, que tendo uma carga global positiva será conduzido até ao eléctrodo por interacções electrostáticas, mas também a formação de um complexo competente a baixa força iónica. Para concentrações de NaCl superiores a 50 mM a diminuição do sinal catalítico e das correntes de pico catódicas sugere que há uma diminuição da interacção membrana - (complexo citocromo *c*₅₅₂ : PCc) - superfície do eléctrodo.

A pH 7,5 a interacção entre o citocromo *c*₅₅₂ e a superfície do eléctrodo é menos influenciada pela força iónica, mantendo-se a intensidade da corrente, o que sugere que a este pH é governada por forças hidrofóbicas (Figura 4.3). Também neste pH a presença de PCc não alterou o comportamento electroquímico do citocromo *c*₅₅₂, pelo que, o sinal catalítico será afectado predominantemente pelo que ocorre entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂. Assim os dois factores que poderão estar a contribuir para estes resultados são, por um lado, a formação do complexo transiente, por outro a activação da PCc. Não havendo dependência do sinal do citocromo *c*₅₅₂ com a força iónica, a pH 7,5 a variação observada corresponde ao efeito da força iónica na catálise mediada. Uma vez que estamos a analisar a reacção intermolecular, este efeito corresponde a alterações na interacção entre as duas proteínas:

(i) A baixa força iónica (~ 1 mM) ocorre a formação de um complexo estável que não favorece a transferência electrónica, o que se traduz em correntes catalíticas inferiores ao valor máximo. Um ligeiro aumento da força iónica poderá influenciar não só a aproximação e a pré-orientação do complexo de encontro, como também favorecer a mobilidade do citocromo *c*₅₅₂ na superfície da PCc- o citocromo procura a melhor posição para a transferência electrónica intermolecular;

(ii) A diminuição do sinal catalítico para concentrações de NaCl superiores 100 mM para pH 7,5 poderá estar relacionada com a dificuldade de formação do complexo competente entre o citocromo *c*₅₅₂ e a PCc, uma vez que o sinal do citocromo não é afectado pela força iónica a pH 7,5 (Figura 4.13). Este complexo de encontro, formado entre as duas proteínas (citocromo *c*₅₅₂ e PCc), é um complexo governado por forças de natureza electrostática (o que não seria compatível com as características das superfícies das duas proteínas; o citocromo *c*₅₅₂ é apolar e a PCc apresenta uma distribuição uniforme dos resíduos carregados na sua superfície) ou se torna inactivo sendo um complexo governado por interacções hidrofóbicas mas não competente para a transferência de electrões. Isto é, o aumento da força iónica poderá ter limitado o movimento do citocromo *c*₅₅₂ na superfície da PCc, impedindo-o de encontrar uma posição favorável à transferência de electrões, formando-se um complexo não produtivo e não competente para a transferência de electrões, o que conduziria a uma diminuição da catálise.

(iii) Tendo em conta a distribuição de resíduos na superfície do citocromo *c*₅₅₂ e da PCc na forma nativa, o complexo formado entre eles deverá ter carácter hidrofóbico e não electrostático, indicando que poderá ter havido alterações da superfície de uma das proteínas, provavelmente da PCc que, como foi verificado no Capítulo 3| 3.6, poderá estar numa forma não nativa, o que explicaria o aparente carácter electrostático do complexo PCc:citocromo *c*₅₅₂ encontrado neste estudo. O citocromo poderia formar um complexo com esta forma não nativa, que apresentaria o hemo E pentacoordenado e ao qual se ligava o citocromo, formando um complexo não competente.

Verifica-se que a presença de NaCl em baixas concentrações (10 mM a 50 mM), no caso da PCc de *Pa. pantotrophus*, promove a formação de spin-alto do hemo P, facilitando a activação da enzima [48]. O mesmo poderá acontecer com a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, isto é, a presença de cloreto de sódio poderá facilitar a formação de spin-alto do hemo P, a baixa força iónica, uma vez que a PCc está inicialmente oxidada o que facilitará a activação da PCc no decurso do ensaio. Este facto explicaria os resultados encontrados para concentrações baixas de cloreto de sódio. De referir ainda que, tal como acontece em *Pa. pantotrophus* na catálise da PCc mediada pela pseudoazurina, também aqui há um aumento da actividade catalítica entre 0 e 50 mM, decrescendo a mesma com o aumento da força iónica [47].

Considera-se assim que o perfil encontrado neste trabalho de investigação reflecte uma interacção entre parceiros demasiado forte a baixa força iónica, o que limitará a mobilidade do citocromo *c*₅₅₂ na superfície da enzima, necessária para uma rápida transferência electrónica. Como sugerido por Pauleta e colaboradores, este facto poderá levar a uma dissociação lenta dos produtos de catálise e à inibição da transferência electrónica [51, 97].

O facto da catálise apresentar valores muito baixos a pH 8,0 (pH do mar mediterrâneo) [261] e a elevada força iónica (salinidade do mar mediterrâneo ~35 ppm), não permitiu estudar a catálise da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ nessas condições ou extrapolar estes resultados para condições *in vivo*. De facto os resultados obtidos contrariam as previsões para a actividade de uma enzima de uma bactéria obrigatoriamente halofílica e marinha.

4.3 Caracterização da cinética de estado estacionário seguida por ensaios espectrofotométricos

A actividade catalítica em estado estacionário da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* usando citocromo *c*₅₅₂ como doador de electrões foi também analisada através de ensaios espectrofotométricos em solução. Em alguns ensaios, em vez do parceiro fisiológico de electrões utilizou-se o citocromo *c* de cavalo como doador electrónico.

No presente trabalho estudou-se o efeito da concentração de PCc, da variação do pH e da força iónica em condições diferentes das utilizadas na literatura, uma vez que houve necessidade de comparar os resultados obtidos por electroquímica para uma mesma preparação de enzima.

Nestes ensaios a PCc foi activada a pH 7,5 e os citocromos reduzidos como descrito no Capítulo 2| 2.8.1.

4.3.1 Efeito da concentração de peroxidase do citocromo *c*

Iniciou-se o estudo da catálise mediada em estado estacionário, seguida por ensaios espectrofotométricos, variando a concentração de enzima PCc entre 6 nM e 90 nM. Nesta gama de concentrações verificou-se que a actividade varia linearmente com a concentração de PCc (Figura 4.14).

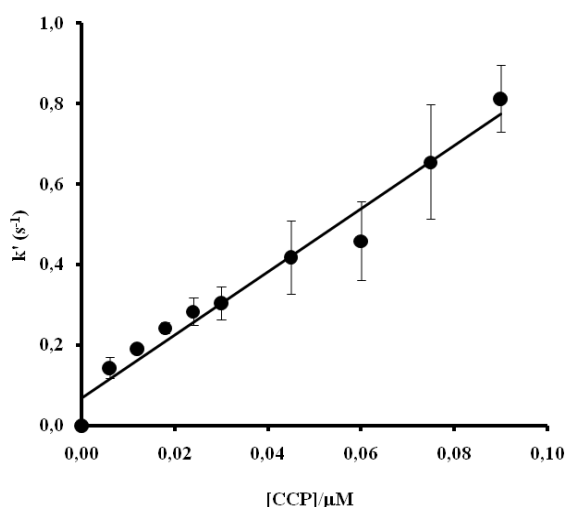


Figura 4.14 A variação da actividade por centro catalítico da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com a concentração de PCc. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), citocromo *c*₅₅₂ 7 μM, CaCl₂ 1 mM e peróxido de hidrogénio 100 μM. Equação da recta: $k' = +0,07 + 8,03[PCc]$, $r = 0,99$. A PCc foi activada como descrito no Capítulo 2| 2.6.1.

Escolheu-se uma concentração de enzima de 24 nM para a caracterização cinética, uma vez que este valor se encontra na zona linear.

Estes dados permitem obter a constante de segunda ordem, uma vez que $v = k'[c_{552}]$ e $k' = k [PCc]$, pelo que nas condições do ensaio k pode ser estimado como sendo $(8,0 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta constante é uma ordem de grandeza acima da estimada nos ensaios electroquímicos nas mesmas condições $((4,3 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,5). Esta diferença poderá estar relacionada com as características e metodologias inerentes a cada técnica. Em espectroscopia de UV-visível a PCc é previamente activada, enquanto nos ensaios electroquímicos esta encontra-se totalmente oxidada na presença de cálcio, e a sua activação deverá ocorrer durante o ensaio voltamétrico, o que poderá explicar os diferentes valores de k . De referir ainda que nos ensaios de electroquímica, a utilização de eléctrodos de membrana não impediu o surgimento de PCc na forma não nativa (Capítulo 3| 3.7) cuja actividade enzimática poderá estar comprometida, o que poderá também explicar este diferencial.

4.3.2 Efeito do pH na actividade do centro catalítico

A actividade da PCc foi estudada a pH entre 4,5 e 9, tendo-se obtido um perfil em forma de sino (Figura 4.16), semelhante ao obtido por electroquímica (Figura 4.15). Os pontos experimentais foram ajustados à equação 2.1 (Capítulo 2| 2.6.1.2)

$$\text{Act. cat.} = \text{Act cat.}_{\text{máxima}} / (1 + 10^{\text{p}K_{a1} - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a2}})$$

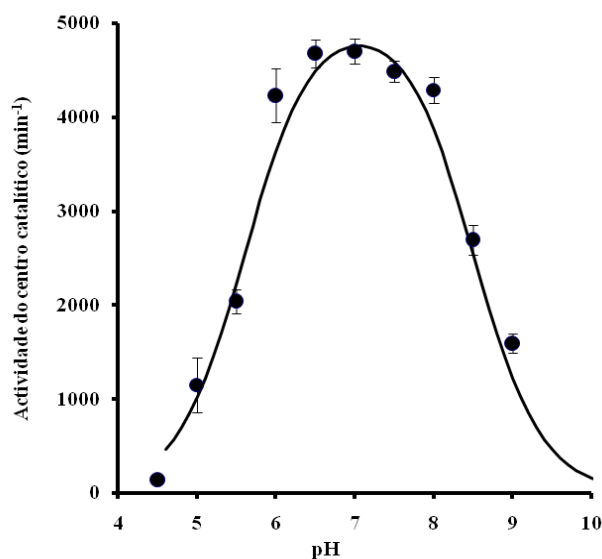


Figura 4.15 Variação da actividade da PCc com o pH. Condições experimentais: citocromo *c*₅₅₂ 7 μM , peroxidase do citocromo *c* 24 nM, CaCl_2 1 mM e peróxido de hidrogénio 100 μM . Soluções tampão utilizadas 10mM: acetato (pH 5,0), MES (5,5 < pH < 6,5), HEPES (7,0 < pH < 7,5), bis-tris-propano (8,0 < pH < 8,5) e CAPS (pH 8,9). O ajuste da curva foi feito utilizando a equação (2.1) com $\text{p}K_{a1} = 5,5 \pm 0,1$ e $\text{p}K_{a2} = 8,5 \pm 0,1$, ocorrendo a actividade máxima para pH 7,0.

Com o melhor ajuste da equação 2.1 aos dados experimentais estimaram-se os valores de $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$ de $5,5 \pm 0,1$ e $8,5 \pm 0,1$ respectivamente, ocorrendo a actividade catalítica máxima a pH 7,0 (utilizando a equação 2.1). No entanto na gama de pH entre 6,5 e 8,0 (pH do mar mediterrânico) a actividade catalítica é semelhante. A transferência electrónica entre o citocromo *c*₅₅₂ e a PCc apresenta uma dependência do pH, a qual sugere que um grupo com um $\text{p}K_a = 5,5 \pm 0,1$ e outro com um $\text{p}K_a = 8,5 \pm 0,1$ favoreçam a actividade catalítica.

O perfil da curva de pH é semelhante ao encontrado para os complexos *Rb. Capsulatus*-citocromo *c*₂ [67] e *Pa. pantotrophus*-citocromo *c*₅₅₀ [205]. Para a PCc de *Rb. capsulatus* verifica-se que a curva de dependência do pH tem a forma sino, com um pH óptimo de 7 e $\text{p}K$ de 6,1 e 7,9. Foi proposto neste caso que o $\text{p}K = 6,1$ resulte da ionização dos propionatos que irão formar par iónico com a histidina 261 que se encontram na vizinhança do ferro hémico. De facto, verifica-se que os propionatos interagem por ligações por pontes de hidrogénio com os ligandos histidina. O $\text{p}K = 7,9$ teria origem na ionização da forma protonada da histidina 261 (próximo do hemo E) ou na do glutamato 114 (próximo do hemo P) [67]. Mutações introduzidas na PCc de *Rb. capsulatus*, onde se substituiu o glutamato por outros aminoácidos, tiveram como resultado a ausência de actividade catalítica, o que apoia a hipótese de ser o Glu 114 o responsável por este $\text{p}K_a$.

Considerando a semelhança estrutural entre as PCc de *Pa. pantotrophus*, de *Rb. capsulatus* e de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, poder-se-á por analogia considerar que os pK_a terão a mesma origem. O pK_{a1} poderá ser atribuído à desprotonação dos propionatos que farão par iónico com a histidina 261 (imidazol, pK_a 6,0, pH 7,0) ou com a histidina 71 que está ligada ao hemo P [53, 67]. Já o resíduo responsável pelo pK_{a2} é proposto ser o glutamato 114 que, embora tenha um pK_a de 4,3 (cadeia lateral) verificou-se em estudos mutagénicos ser essencial para a catálise [49, 59, 65, 67, 71 e 206]. No entanto com os resultados deste trabalho não é possível identificar inequivocamente os resíduos responsáveis pelos pK_a . [49, 59, 65, 67, 71 e 206].

Embora o pK_{a1} seja semelhante ao estimado por ensaios electroquímicos ($5,8 \pm 0,1$), o pK_{a2} é ligeiramente superior ao obtido naqueles estudo ($7,5 \pm 0,1$) o mesmo acontecendo com o pH ótimo (pH 6,6). A diferença no valor de pK_{a2} poderá ser explicada pelo facto da PCc nos ensaios de electroquímica não estar activada no início do ensaio e poder sofrer alterações conformacionais devido ao campo eléctrico, apresentando conformações diferentes nos ensaios de electroquímica e de espectroscopia UV-visível, podendo esse facto condicionar a transferência intermolecular no complexo transiente, que se forma entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂, tal como foi referido anteriormente. Também é plausível, que os resultados de electroquímica possam ser artificiais (fictícios) e consequência da metodologia utilizada, dado que, nos ensaios por espectroscopia do visível a gama de pH onde a actividade catalítica é elevada (pH entre 6,5 e 8) inclui o pH do meio onde a bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* vive (pH próximo de 8) [261] e é maior que em electroquímica.

4.3.3 Efeito da força iónica na catálise mediada

O efeito da força iónica na actividade catalítica da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ e pelo citocromo *c* de cavalo foi analisado tendo-se obtido o perfil apresentado na Figura 4.16.

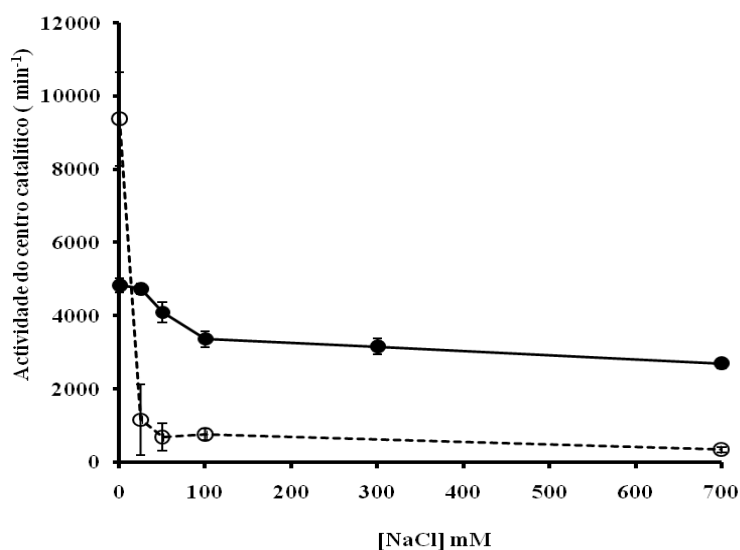


Figura 4.16 Actividade por centro catalítico da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* em função da concentração de NaCl a pH 7,5, usando (●) o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* ou (○) o citocromo *c* de cavalo como doador de electrões. Condições experimentais: tampão HEPES 10 mM (pH 7,5), citocromo *c*₅₅₂ 7 µM, citocromo *c* de cavalo 7 µM, peroxidase do citocromo *c* 24 nM, CaCl₂ 1 mM e peróxido de hidrogénio 100 µM.

Quando o citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é usado como doador electrónico a actividade catalítica diminui 40% com o aumento da força iónica de 0 para 100 mM de NaCl, valor a que se atinge um patamar onde a actividade por centro catalítico é 3000 min⁻¹ e se mantém constante até 700 mM de NaCl.

Quando o citocromo *c* de cavalo é usado como doador electrónico, a actividade catalítica inicial (na ausência de NaCl) é superior à que se obtém com o citocromo *c*₅₅₂ (9700 min⁻¹). No entanto, esta decai abruptamente para valores muito baixos (actividade praticamente nula) com o aumento da concentração de cloreto de sódio. Neste caso, a catálise apresentou um decréscimo de 95% em relação ao seu valor na ausência de NaCl.

Um perfil semelhante a este foi obtido por Alves e colaboradores [70], tendo estes constatado que o par citocromo *c*₅₅₂- PCc mantém actividade catalítica (actividade do centro catalítico próxima de 5000 min⁻¹) a elevada força iónica (0 a 600 mM). No estudo realizado por estes investigadores, a 35 ppm (salinidade do mar) a enzima apresenta valores elevados de actividade do centro catalítico que variam entre 5000 min⁻¹ e 6000 min⁻¹ [70]. Este comportamento foi justificado com interacções hidrofóbicas entre os parceiros fisiológicos, que não eram afectadas pela elevada força iónica. A catálise da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ a força iónica baixa deverá estar relacionada com a optimização de condições para que os dois parceiros formem um complexo de encontro produtivo, transiente e estável com energia mínima. Com o aumento da força iónica, há perda de mobilidade dentro do complexo,

formando-se um complexo de encontro imóvel, onde as proteínas não conseguem alcançar a configuração activa e produtiva, ou o complexo de encontro realiza a catálise com baixas velocidades de dissociação dos produtos da mesma [47, 182].

O resultado encontrados para a catálise da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mediada pelo citocromo *c* está de acordo com o resultado reportado anteriormente por Alves e colaboradores, onde se verificou que na presença de uma força iónica moderada (salinidade de 7,5 ppm, correspondente a uma concentração de NaCl de 132 mM) o citocromo *c* de cavalo não é um doador de electrões competente [70]. A diminuição da actividade catalítica mediada pelo citocromo *c* de cavalo com o aumento da força iónica está relacionada com as interacções de natureza predominantemente electrostática que se estabelecem no complexo de encontro entre a PCc e o citocromo *c* de cavalo. De referir que em ensaios cinéticos entre a PCc de *Ps. stutzeri* e o citocromo *c* de cavalo, a presença de ião cálcio inibiu a oxidação do citocromo *c* de cavalo o que se reflectiu na diminuição da actividade enzimática detectada [58], podendo o mesmo ter acontecido nestes ensaios.

Contrariamente à interacção entre o citocromo *c* de cavalo e a PCc, que apresenta um carácter puramente electrostático, o sistema citocromo *c*₅₅₂:PCc apresenta um carácter hidrofóbico (o citocromo *c*₅₅₂ tem uma superfície maioritariamente apolar embora apresente também alguns resíduos carregados (Figura 1.16)). O par redox PCc-citocromo *c*₅₅₂ retém actividade catalítica numa grande gama de força iónica (até 700 mM), o que é compatível com um complexo com um carácter hidrofóbico, tal como tinha sido proposto por Alves e colaboradores [70]. A composição de aminoácidos da superfície da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* revela que esta apresenta mais resíduos hidrofóbicos do que resíduos carregados, o mesmo acontecendo com o citocromo *c*₅₅₂ que apresenta uma superfície apolar, Figura 1.16.

O citocromo *c* de cavalo, com uma carga positiva nas vizinhanças do hemo, apresenta carga contrária à da superfície de interacção da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e irá interagir com esta por interacções electrostáticas. O aumento da força iónica reduz a interacção entre a PCc e o citocromo *c* de cavalo, diminuindo a sua interacção electrostática, o que provoca a desagregação do complexo com o consequente decaimento da actividade enzimática. Este comportamento é semelhante ao verificado no caso das PCc de *Ps. stutzeri* e de *Pa. pantotrophus* para concentrações de NaCl superiores a 50 mM [47, 51, 97].

De referir ainda que, o complexo PCc-citocromo *c*₅₅₂ retém ainda 60% da actividade, a uma concentração de NaCl de 616 mM (correspondente à salinidade do mar de 35 ppm) e a pH 8,0, o que poderá indicar que estamos em presença do complexo que se forma *in vivo*.

A diferença entre os resultados obtidos por técnicas electroquímicas e por técnicas espectroscópicas poderá ser explicada, pela possível presença nos ensaios electroquímicos de

PCc não activada ou não nativa o que poderá contribuir para uma diminuição das correntes catalíticas, uma vez que provavelmente nenhuma destas formas de PCc formará um complexo competente com o citocromo *c*₅₅₂.

4.4 Conclusão

O estudo da catálise mediada pressupõe a formação de um complexo competente e estável entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂. A formação deste complexo de transferência de electrões implica que as duas proteínas se encontrem, interactuem e se rearranjem de modo a que a transferência seja possível. Durante este processo estão envolvidas forças de natureza electrostática, hidrofóbicas, formação de pontes de hidrogénio e em alguns casos a formação de pontes salinas.

O estudo da catálise da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ foi efectuada, neste trabalho pela primeira vez, usando técnicas electroquímicas e eléctrodo de membrana de grafite pirolítica não rotativo. Este estudo electroquímico permitiu confirmar a vantagem de utilizar eléctrodos de membrana de GP no estudo de proteínas, uma vez que não foi necessário usar um promotor. No entanto verificou-se que, em algumas condições, a carga da membrana pode condicionar a interacção entre as proteínas e a superfície do eléctrodo, como se verificou no estudo da catálise da PCc medida pelo citocromo *c*₅₅₂ a pH 6,5.

A catálise mediada apresentou um perfil típico de cinética de Michaelis-Menten e um K_M de $65 \pm 2 \mu M$, para o substrato peróxido de hidrogénio, tendo-se estimado uma constante de transferência electrónica intermolecular de $(4,1 \pm 0,1) \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a baixa força iónica e pH 7,5. Este valor, semelhante ao reportado para a catálise de outras enzimas mediadas pelo mesmo citocromo [165, 169], evidência que a transferência electrónica ocorre a velocidades semelhantes. Verificou-se no entanto que, a constante de transferência electrónica intermolecular foi uma ordem de grandeza menor quando se utilizou métodos electroquímicos em comparação com os métodos espectroscópicos, o que poderá estar relacionado com o estado redox da PCc- nos ensaios de electroquímica a PCc estava inicialmente no estado oxidado (inactiva) e nos de espectroscopia em valência mista- e com o possível surgimento de PCc não nativa. Este facto revelou-se importante na interpretação de resultados, uma vez que se verificou que a amostra da enzima presente nos ensaios voltamétricos provavelmente não estaria totalmente activa, o que levou a menores valores de constante de transferência intermolecular e a ligeiras diferenças entre os resultados obtidos por espectroscopia e por electroquímica.

O efeito do pH na catálise mediada foi analisado por ambas as técnicas. O perfil da curva encontrado pelas duas técnicas foi semelhante, tendo-se estimado dois valores de pK_a . Tendo em conta o valor de pK_{a1} obtido por técnicas electroquímicas ($5,8 \pm 0,1$) e o encontrado

pelo estudo em estado estacionário ($5,5 \pm 0,1$), foi proposto que a desprotonação dos propionatos do hemo E e da histidina 261 (imidazol, pK_a 6,0) localizada nas proximidades do hemo E sejam responsáveis pelo pK_{a1} . Verifica-se que a protonação favorece a catálise, sendo plausível que a desprotonação de um dos grupos propionatos possa estar relacionada com o movimento da histidina 275 e com a alteração da rede de ligações de hidrogénio, inerente à activação da enzima. O pK_{a2} estimado difere nas duas técnicas (técnicas electroquímicas $pK_{a2} = (7,5 \pm 0,1)$ e por estudos espectroscopia do visível $pK_{a2} = (8,5 \pm 0,1)$) podendo explicar-se esta discordância com o facto de nos ensaios electroquímicos a enzima não estar activada ou não estar na forma nativa. Considerando que nos ensaios de espectroscopia a enzima está na forma activa, propõe-se que responsável pelo $pK_{a2} = (8,5 \pm 0,1)$ seja ou histidina 71 ou resíduo glutamato (Glu 114) que se mostrou muito importante na catálise em estudos mutagénicos e que estando próximo do hemo P poderá quebrar a ligação O-O do peróxido de hidrogénio. A protonação deste resíduo afecta a catálise enzimática [61, 62 e 65].

Também se analisou por ambas as técnicas o efeito da força iónica na formação do complexo PCc:Citocromo *c*₅₅₂ e na catálise mediada. Para se formar um complexo transiente entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂, estas duas proteínas necessitam de se aproximar, sendo que a primeira interacção será predominantemente electrostática- a carga global do citocromo *c*₅₅₂ é +4 e nas proximidades do hemo E da PCc surgem principalmente resíduos neutros ou carregados negativamente [189]. Nos estudos espectrofotométricos da actividade catalítica com a variação da força iónica, surgem evidências experimentais de uma interacção entre parceiros inicialmente governada por forças electrostáticas, uma vez que um aumento ligeiro da força iónica não diminui a catálise enzimática. De facto as forças electrostáticas entre parceiros fisiológicos influenciam a formação de complexos, podendo contribuir para a aproximação das moléculas, reconhecimento entre parceiros e estabilidade dos complexos formados [189, 260-262] e influenciar a estabilidade e reactividade do mesmo, bem como a velocidade de dissociação dos produtos [51, 97 e 206]. Verifica-se contudo que o complexo PCc-Citocromo *c*₅₅₂ é governado principalmente por forças hidrofóbicas, uma vez que mantêm actividade a elevada força iónica, isto é, a pH 7,5 este complexo retém 60 % da actividade. No estudo electroquímico da catálise da PCc mediada pelo citocromo *c*₅₅₂, a pH 7,5, a diminuição desta ocorre para uma concentração de NaCl superior a 200 mM, sendo da ordem dos 84%, o que poderá estar relacionado com artifícios introduzidos pela membrana ou pela presença de PCc numa forma não nativa.

A diferença de valores encontrados entre os ensaios electroquímicos e espectrofotométricos, pode ser justificada pelas diferentes condições iniciais utilizadas (nos ensaios electroquímicos a solução de trabalho usada na membrana tinha pH 7,5 e a enzima apresentava-se oxidada em presença de iões cálcio (enzima inactiva), já nos ensaios

espectrofotométricos a enzima estava em valência mista e activada) e pela existência de PCc na forma não nativa, verificada no capítulo 3| 3.7, uma vez nestas condições não se forma um complexo competente com o citocromo *c*₅₅₂, o que faz diminuir as correntes catalíticas. De realçar no entanto que a presença desta forma não nativa não interfere com os sinais electroquímicos, uma vez que se verificou que factores como a adsorção e a presença de formas desnaturadas não interferem com o sinal electroquímico nos eléctrodos de membrana [164, 171 e 211]

Constatou-se ainda que, o peróxido de hidrogénio mostrou inactivar a PCc ao longo do tempo sendo uma limitação à metodologia utilizada. Este resultado poderá estar relacionado com a formação de uma espécie não activa da enzima [158]. No entanto este facto não afecta os resultados, quando se utilizam ensaios em que o intervalo de tempo entre a adição de peróxido e a recolha de dados ocorre até 5 minutos, mesmo quando se usa o peróxido em concentrações saturantes, uma vez que nestas condições aparentemente não diminuiu a actividade catalítica da enzima (curva de Michaelis-Menten).

A utilização de eléctrodos de membrana permitiu o uso de quantidade de PCc e de citocromo *c*₅₅₂ na ordem dos micrólitros permitindo estudar várias condições. No entanto um melhoramento ao método seria a activação prévia da enzima antes do ensaio voltamétrico, como se procedeu nos ensaios espectrofotométricos, o que iria garantir que a enzima se encontrava sempre em valência mista (condição necessário para que a enzima active) quando interage com o citocromo *c*₅₅₂.

A baixa força iónica o citocromo *c* de cavalo, doador de electrões da PCc não fisiológico, apresenta-se cineticamente competente. O complexo entre ambos é consistente com um complexo governado por forças electrostáticas em que existe um local de ligação de elevada afinidade. O aumento da força iónica provoca a dissociação deste complexo.

CAPÍTULO 5 | CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE
TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA ENTRE A PEROXIDASE DO
CITOCROMO *c* E O CITOCROMO *C*₅₅₂ DE *MARINOBACTER*
HYDROCARBONOCLASTICUS

5.1 Interação peroxidase do citocromo *c*: citocromo *c*₅₅₂

A formação de complexos entre proteínas pode ser estudada utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão [194- 198]. O espectro de ¹H-RMN de uma proteína é alterado sempre que ocorrem processos de permuta química, ou seja, quando o ambiente em torno dos núcleos se altera. Seguindo as ressonâncias de protões associadas a uma das proteínas do complexo é possível saber se a velocidade de permuta do protão entre a proteína livre e ligada é lenta (observam-se separadamente as ressonâncias da proteína livre e do complexo), intermédia (há um alargamento e diminuição do sinal do proteína livre e o surgimento do sinal do complexo, que estreita e aumenta à medida que a sua quantidade aumenta) ou rápida (observa-se a posição média das ressonâncias correspondentes às formas livres e ligadas da proteína), sendo ainda possível estimar a constante de ligação do complexo quando a permuta é rápida ou lenta [194- 196].

A titulação do citocromo *c*₅₅₂ com PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* por espectroscopia de ¹H-RMN, baseia-se na análise da perturbação do desvio químico de protões do citocromo *c*₅₅₂, que se pode encontrar ligado à PCc ou livre [52, 166, 184, 195- 197]. Esta metodologia permite determinar a estequiometria do complexo e obter uma estimativa da ordem de grandeza da constante de ligação para o complexo transiente formado entre a peroxidase do citocromo *c* e o citocromo *c*₅₅₂. Com o objectivo de analisar a formação do complexo entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂, efectuou-se o estudo na presença de excesso de cloreto de cálcio, com ambas as proteínas no estado oxidado. A escolha deste estado de oxidação teve como objectivo evitar a transferência de electrões entre ambas, o que levaria a uma alteração do estado de oxidação *c*₅₅₂ de férrico para ferroso, passando o ferro a ser um centro diamagnético, o que não permitiria seguir esta titulação com esta técnica. O espectro de ¹H-RMN do citocromo *c*₅₅₂ oxidado apresenta-se na Figura 5.1.

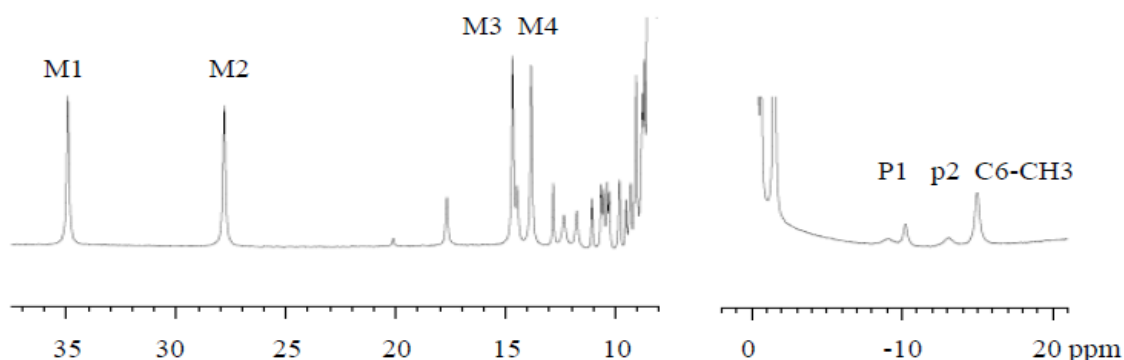


Figura 5.1 Espectro ¹H-RMN da forma oxidada de 234 μ M de citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* (Tris-HCl 1 mM (pH 7,5), CaCl₂ 2 mM, 303 K). O espectro foi adquirido num espectrómetro de RMN AVANCE III (600Hz) equipado com uma crio-sonda TCI. As ressonâncias identificadas como M1, M2, M3 e M4, são respectivamente a 34,95 ppm, 27,85 ppm, 14,67 ppm e a 13,83 ppm. A ressonância identificada como C₆-CH₃ está localizada a -15,1 ppm e é atribuída ao grupo ϵ -CH₃ da metionina axial [165].

Tal como foi referido no Capítulo 1 | 1.3.1, o espectro de ¹H-RMN, da forma oxidada do citocromo *c*₅₅₂ é típico de um citocromo *c* de spin-baixo, com coordenação metionina-histidina [165]. As quatro ressonâncias dos grupos metilo que estão deslocadas para campo baixo (entre 13 e 30 ppm) devido ao efeito paramagnético do Fe (III) hémico, foram utilizadas para seguir a titulação da PCc (Figura 5.1). Na Figura 5.2 apresenta-se os espectros obtidos durante esta titulação.

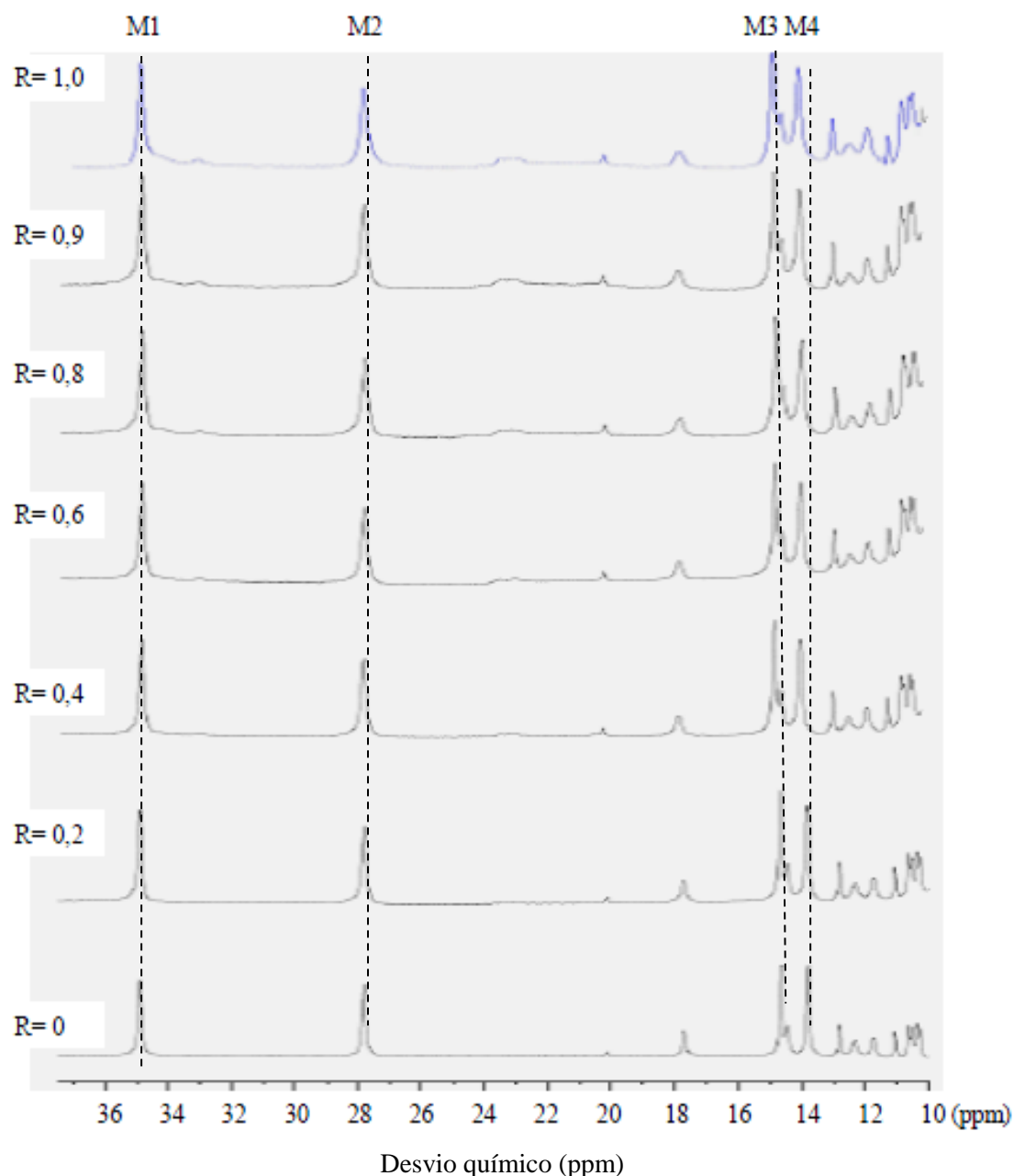


Figura 5.2 Titulação do citocromo *c*₅₅₂ com peroxidase do citocromo *c*. Condições experimentais: espectros foram adquiridos num espectrómetro de RMN AVANCE III (600Hz) equipado com uma sonda TCI. A titulação efectuou-se em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), CaCl₂ 2 mM, a 303 K.

A adição de peroxidase à solução com citocromo *c*₅₅₂ provoca pequenos desvios das ressonâncias de M3 e M4 para campo mais baixo e um ligeiro alargamento das mesmas, o que indica que há formação de um complexo e que este está em permuta rápida entre a forma livre e a forma ligada à peroxidase do citocromo *c*, no tempo de escala do RMN (Figura 5.2) [52, 166, 195- 197].

Na Tabela 5.1 estão indicadas as variações no desvio químico das ressonâncias dos metilos hémicos do citocromo *c*₅₅₂ induzidas pela adição de PC*c*.

Tabela 5.1 Variações no desvio químico dos metilos hémicos do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, induzidas pela formação do complexo.

Desvio químico (ppm) - citocromo <i>c</i> ₅₅₂			
Metilos hémicos*	livre	ligado	Δ(ppm)
Hemo- CH ₃ (M1)	34,93 ppm	34,92	-0,01
Hemo- CH ₃ (M2)	27,85 ppm	27,83	-0,02
Hemo- CH ₃ (M3)	14,67 ppm	14,70	+0,03
Hemo- CH ₃ (M4)	13,83 ppm	13,90	+0,07

*nomenclatura utilizada para o anel de protoporfirina é da IUPAC-IUB (Capítulo 3 | 3.4.3)

As pequenas variações nos desvios químicos podem ser atribuídas a uma perturbação nas vizinhanças do hemo do citocromo *c*₅₅₂ após ligação com a PC*c*, isto é, à formação do complexo transiente. Este resultado é consistente com a observação de um ligeiro alargamento de linhas das ressonâncias dos metilos M4 e M3, consequência da interacção proteína-proteína. No entanto verifica-se que todos os metilos sofrem variações nos desvios químicos. A ressonância denominada M4 poderá corresponder ao metilo 1-CH₃ do hemo por ser o que se encontra mais exposto ao solvente, e por isso aquele que irá interagir com a superfície da peroxidase do citocromo *c* [67, 197 e 205].

Verifica-se que, quanto mais dinâmico é o complexo, menores são as alterações nos desvios químicos. O facto dos desvios químicos experimentais serem reduzidos indica então que, estamos em presença de um complexo dinâmico e específico [183, 209].

As alterações nas posições das ressonâncias podem ser usadas para determinar a estequiometria do complexo e estimar a constante de dissociação, *k*_D [201]. Assim sendo a determinação da estrutura quaternária e da constante de formação do complexo citocromo *c*₅₅₂-peroxidase foi efectuada a partir da variação da posição de ressonância do sinal dos protões do metilo M4. Na Figura 5.3 está representada a variação do desvio químico desse metilo em função da razão PC*c*/citocromo *c*₅₅₂.

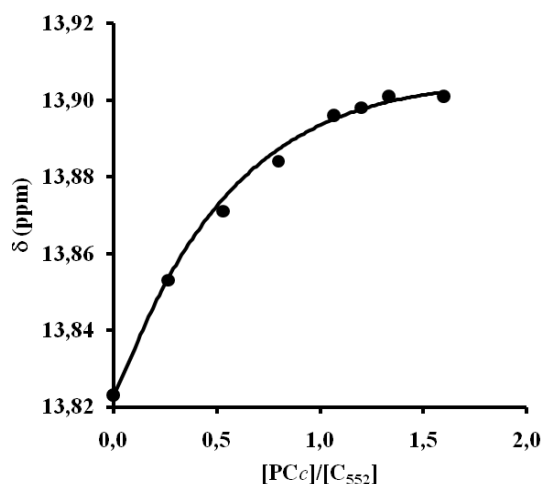


Figura 5.3 Variação do desvio químico dos grupos metilo M4 (1-CH₃) do citocromo *c*₅₅₂, em função da razão entre peroxidase do citocromo *c* e o citocromo *c*₅₅₂. A curva foi simulada tendo em conta a formação de um complexo 1:2 sendo estimada uma constante de dissociação de $K_D = 47 \mu\text{M}$.

Esta curva apresenta um ponto de saturação a uma razão molar PCc/citocromo *c*₅₅₂ de cerca de 1:1, indicando que nas condições usadas (baixa força iónica, pH=7,5, citocromo *c*₅₅₂ oxidado) a estequiometria do complexo é de 1 monómero de PCc: 1 dímero de citocromo *c*₅₅₂ (um dímero de PCc irá ligar-se a dois dímeros de citocromo *c*₅₅₂).

A constante de dissociação do complexo foi estimada a partir de simulações da curva experimental como foi descrito no Capítulo 2| 2.7.3, sendo $47 \mu\text{M}$ para o complexo PCc-2Citocromo *c*₅₅₂. Esta constante de dissociação é maior do que a encontrada para o complexo citocromo *c*₅₅₂:N₂OR de *Ma. hydrocarbonoclasticus* ($5 \mu\text{M}$) [166], para o complexo citocromo *c*₅₅₀:PCc de *Pa. pantotrophus* ($5 \mu\text{M}$) [205], citocromo *c* de cavalo:PCc de *Pa. pantotrophus* ($5 \mu\text{M}$) [197] e para o complexo citocromo *c* de cavalo: PCc (de levedura) [97, 194]. No entanto é de salientar que esta constante de ligação foi estimada para o complexo com o citocromo *c*₅₅₂ oxidado e que *in vivo* o citocromo só actua como dador de electrões quando se encontra reduzido, podendo a afinidade para com a peroxidase ser diferente nesse estado de oxidação.

Os complexos proteína-proteína podem ser agrupados em complexos transientes e complexos estáticos (complexos que requerem ligações de alta-especificidade, apresentam constantes de dissociação baixas, como por exemplo os complexos antígeno-anticorpos ou as enzimas e os inibidores) [261- 263]. Tendo em atenção os resultados experimentais obtidos neste trabalho, isto é o k_D na ordem micromolar, podemos afirmar que estamos perante um complexo transiente, o que irá implicar elevadas velocidades de catálise, o que se confirmou no Capítulo 4|.

5.2 Modelo estrutural do complexo PCc: Cit *c*₅₅₂

O conhecimento da estrutura de um complexo proteína-proteína é essencial para entender o processo de transferência electrónica durante a interacção entre duas proteínas parceiras biológicas. Dados estruturais de complexos e das proteínas que os constituem têm sido obtidos através de técnicas como a difracção por raio-X, RMN, RPE e simulações de atracamento molecular utilizando diferentes algoritmos, como foi referido no Capítulo 1|.

Neste trabalho o modelo estrutural do complexo PCc:2*c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi obtido usando o algoritmo BiGGER no modo de atracamento suave [200, 201]. Para realizar este estudo foram usadas as estruturas da peroxidase do citocromo *c* (proteína alvo), dos citocromos *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e do citocromo *c* de cavalo (proteína sonda), depositadas no RCSB Protein Data Bank.

5.2.1 As estruturas da PCc (proteína alvo) e dos citocromos *c* (sondas)

As estruturas tridimensional da PCc obtidas a pH 4,0 (forma inactiva) e a pH 5,3 (forma activa) já descritas no Capítulo 1| 1.3, apresentam um enrolamento semelhante com 12 hélices α e 5 cadeia β (Figura 5.4). A PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma inactiva apresenta uma superfície com uma maior quantidade de resíduos carregados (Figura 5.4-A). Na forma activa (Figura 5.4-B) observa-se junto dos hemos E uma área sem resíduos carregados e entre os domínios hémicos o íão cálcio.

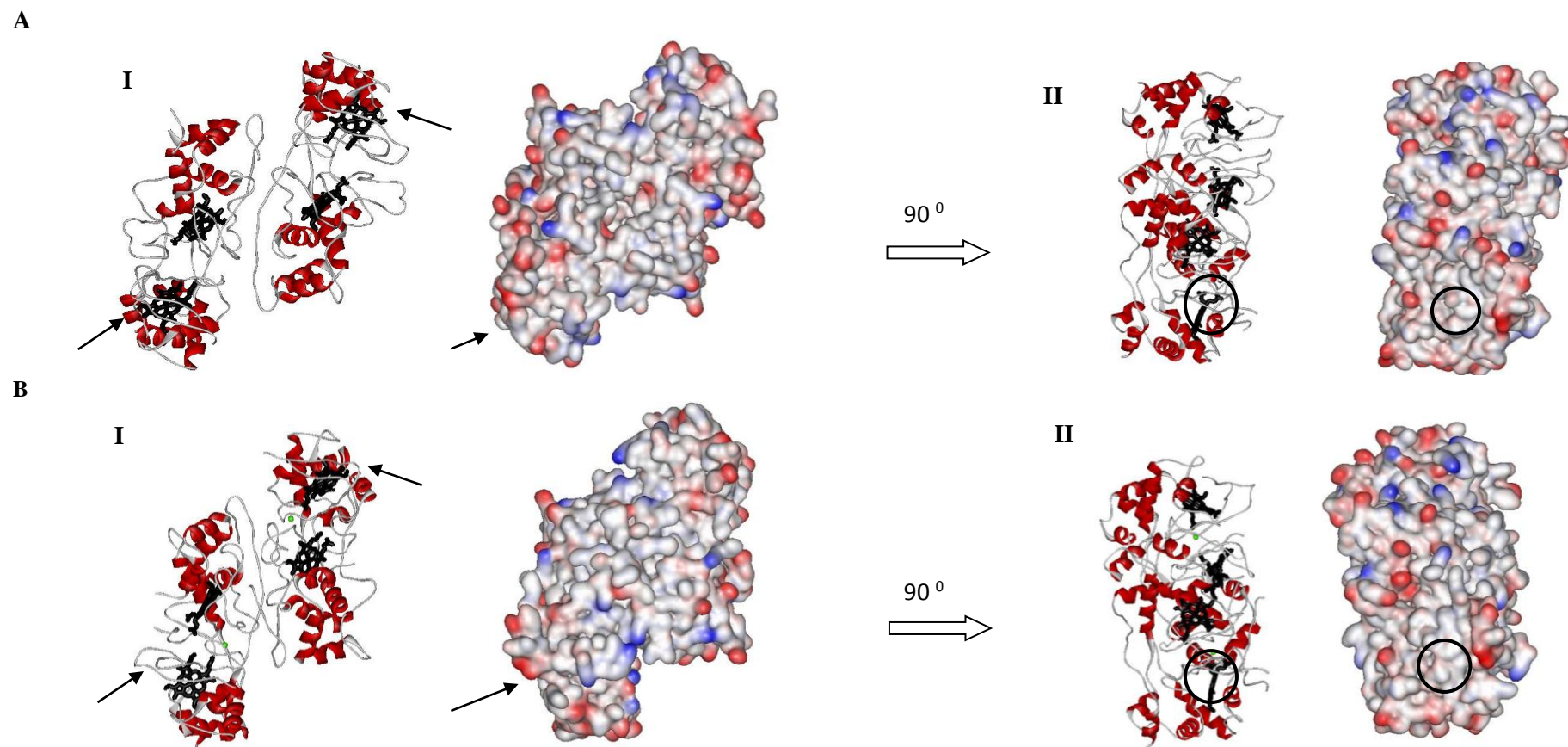


Figura 5.4 (A) Estrutura (imagem da esquerda) e superfície de potencial electrostático (imagem da direita) da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma inactiva (código do PDB 1IRZ6). (B) Estrutura (imagem da esquerda) e distribuição de resíduos carregados na superfície (imagem da direita) da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma activa (código do PDB 1IRZ5). As cadeias de aminoácidos estão coloridas de acordo com a estrutura secundária, os hemos estão coloridos a preto e o ião cálcio a verde. Na representação da superfície a coloração azul representa as partes básicas carregadas positivamente na superfície da proteína e a vermelha representa os resíduos ácidos negativamente carregados da superfície da proteína. As imagens da PCc (I) rodadas 90° (II) sobre o eixo dos xx. A vizinhança do hemo E da PCc exposto ao solvente (provável local de interacção com o citocromo *c*) está circundada a preto na representação da superfície da enzima ou assinalado com uma seta na estrutura da proteína. Figuras preparadas com o software Accelrys Viewerlite.

Pela distribuição de resíduos carregados na superfície da PCc, verifica-se que nas vizinhanças do hemo E a superfície é predominantemente hidrofóbica (Figura 5.5-A II e 5.5-B II- circundada a preto) embora surjam alguns resíduos carregados negativamente (na Figura 5.5-A II e 5.5-B II estão assinalados a vermelho).

A estrutura do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e do citocromo *c* de cavalo apresentam-se na Figura 5.5.

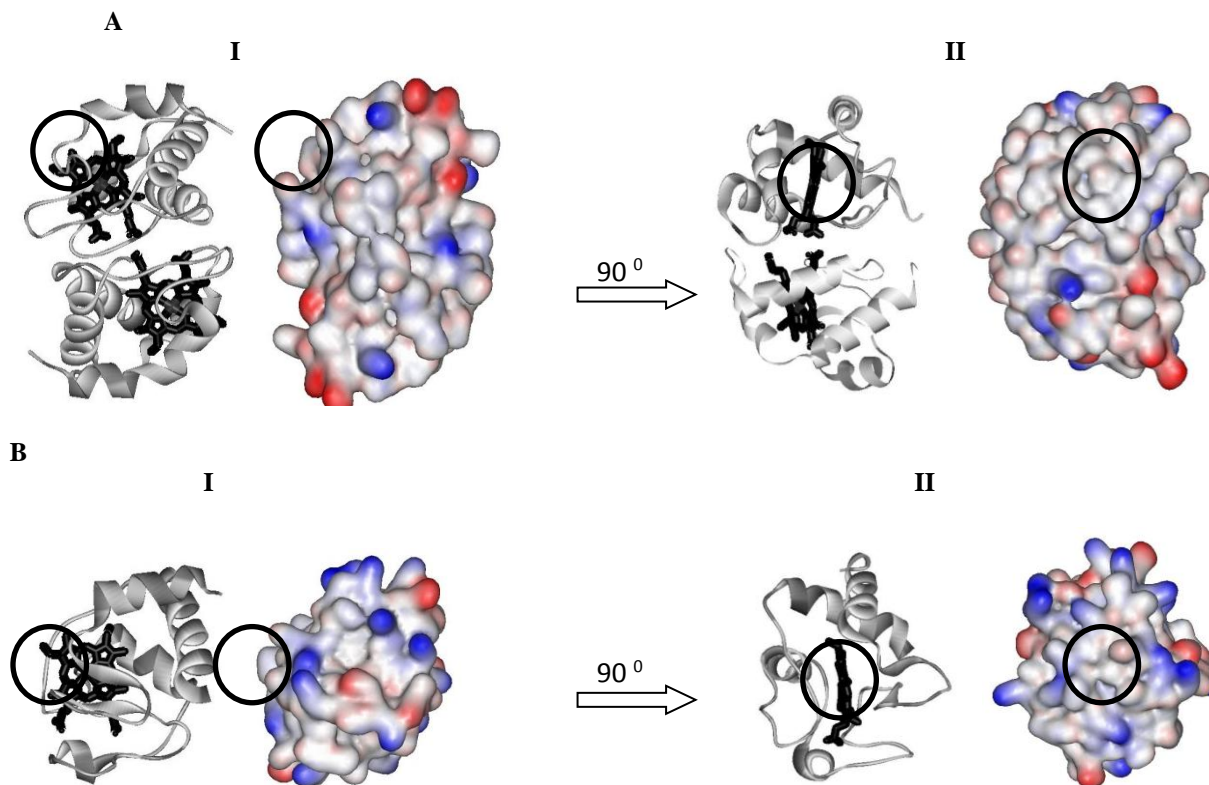


Figura 5.5 Estrutura e superfície de potencial electrostático (A) do citocromo *c*₅₅₂ de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e (B) do citocromo *c* de cavalo. Na fórmula estrutural a cor cinzenta apresenta-se a estrutura secundária dos citocromos e os hemos estão coloridos a preto. Na representação de potencial electrostático os resíduos carregados positivamente na superfície da proteína tem a coloração azul e os resíduos ácidos negativamente carregados da superfície da proteína a cor vermelha. As imagens de cima e de baixo encontram-se na mesma disposição, a representação I está rodada 90° (representação II) sobre o eixo dos YY. Circundada a preto está a vizinhança do metilo exposto ao solvente. Figuras preparadas com o software Accelrys Viewerlite

Os citocromos *c* apresentam uma forma diferente, sendo a forma do monómero do citocromo *c* de cavalo esférica e a do dímero do citocromo *c*₅₅₂ oval. No citocromo *c*₅₅₂ a os resíduos carregados concentram-se em áreas afastadas do metilo ligado ao hemo e mais exposto ao solvente, M4, sendo a superfície maioritariamente apolar na vizinhança desse metilo (Figura 5.5-A). No citocromo *c* de cavalo há uma distribuição mais uniforme de resíduos carregados na superfície do citocromo; nas proximidades do metilo mais exposto ao solvente existem alguns resíduos carregados (Figura 5.5-B).

5.2.2 Simulações de atracamento molecular

As simulações de atracamento molecular com o algoritmo BiGGER [200, 201] têm sido utilizadas para obter modelos estruturais de complexos entre peroxidases do citocromo *c* e os seus parceiros fisiológicos [52, 166, 197, 205, 206 e 209]. Este algoritmo efectua uma procura sistemática de posições de atracamento da proteína sonda, no espaço rotacional da proteína alvo, obtendo-se deste modo um grande número de soluções para o complexo. Este algoritmo quando é executado no modo de “atrachamento-suave”, como neste trabalho, permite ter em conta alguma liberdade conformacional das cadeias laterais dos resíduos à superfície da proteína, isto é, considera alguma mobilidade das cadeias laterais e flexibilidade na superfície estrutural [52, 197, 206 e 209].

Numa primeira fase do atracamento molecular, o BiGGER “pesquisa” no espaço (tridimensional) posições prováveis (soluções) para a interacção/contacto entre as proteínas. Geram-se 5000 possíveis geometrias para esse complexo, que são depois avaliadas de acordo com a superfície de contacto. No presente estudo foram seleccionadas soluções com uma superfície de contacto superior a um limite mínimo de 500. As soluções seleccionadas foram ordenadas por classificação global pelo programa chemera, tendo em conta vários parâmetros, como a hidrofobicidade, ajuste geométrico, interacção entre cadeias laterais e interacções electrostáticas.

Numa segunda fase de avaliação (realizada pelo operador), determinou-se a distância entre o ião ferro do hemo E, para qualquer um dos ferros dos hemos do dímero do citocromo *c*₅₅₂, utilizando o programa Chemera. Somente as soluções que se encontram entre as 500 melhores por classificação global, electrostática ou hidrofobicidade e que apresentam uma distância inferior a 20 Å entre os ferros hémicos do hemo E da PC*c* e dos citocromos *c* foram posteriormente analisadas [183, 191 e 192]. O limite de 20 Å foi escolhido porque esta ser a distância máxima para a transferência de electrões entre centros redox de proteínas [183, 184, 191 e 192]. A transferência de electrões, quando acontece entre centros redox de proteínas a distâncias acima de 14 Å, ocorre através do mecanismo de “electron tunneling” [191 e 192].

No Capítulo 3| 3.3 verificou-se que a PC*c* se encontra em solução na forma dimérica tal como o citocromo *c*₅₅₂, tendo-se efectuado simulações de atracamento molecular com o monómero e com o dímero da PC*c*.

Para a análise e interpretação dos resultados obtidos do atracamento molecular é necessário ainda ter em conta que, para que ocorra transferência de electrões entre parceiros é necessário que haja acoplamento electrónico, o que diminui com a distância entre o centro doador (ferro do citocromo *c*) e o centro receptor (hemo E da PC*c*), que esta é influenciada pela

orientação dos parceiros e pelo ambiente em que decorre nomeadamente pelo tamanho e orientação da interface entre as duas proteínas [182- 184, 250- 252, 258 e 260].

i) Complexo citocromo *c*₅₅₂ e PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

Após a execução do primeiro e segundo passo como descrito anteriormente, verificou-se neste último passo que as soluções putativas de atracamento, seriadas por classificação global, para o complexo entre o dímero cit *c*₅₅₂: dímero da PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, com 500 contactos eram em número muito reduzido, pelo que se efectuou novo atracamento molecular com os dímeros e monómeros da PCc (para minimizar soluções inválidas) considerando como valor mínimo de contacto 300 resíduos.

Pela análise das quinhentas melhores soluções da simulação de atracamento, e comparando o número de soluções utilizando para o contacto mínimo 300 ou 500, verifica-se que a simulação de atracamento com o valor de 300, para contacto mínimo, apresenta mais soluções com distância menor que 20 Å e com melhor ranking global (Figura 5.6).

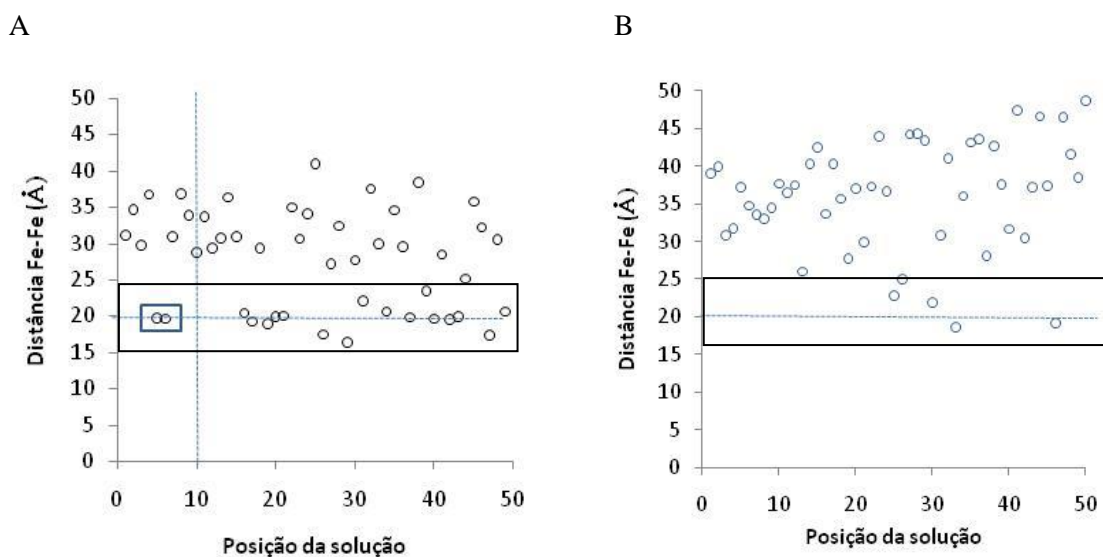


Figura 5.6 A Distância entre os hemos do citocromo *c*₅₅₂ e o hemo de transferência de electrões da peroxidase do citocromo *c* para as 50 melhores soluções da simulação de atracamento entre o dímero do citocromo *c*₅₅₂ e o dímero da peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* na forma oxidada com (A) 300 contactos e com (B) 500 contactos. As soluções dentro das caixas, são as que apresentam simultaneamente uma posição de classificação global e uma distância reduzida entre os ferros hémicos (citocromo *c*₅₅₂ – hemo E).

Pela observação dos gráficos da figura anterior (Figura 5.6) é possível constatar que a quantidade de soluções putativas encontradas no atracamento PCc-cit *c*₅₅₂, com distância entre o hemo E e o hemo do citocromo inferior a 20 Å é reduzida. Verifica-se também que na simulação de atracamento molecular com o dímero de PCc na forma de oxidada se encontram pelo menos duas soluções putativas nas primeiras dez, das melhores 500 soluções por

classificação global, com distância entre o hemo E da PCc e o hemo do citocromo *c*₅₅₂ inferior a 20 Å, quando se consideram 300 contactos.

Nesta análise de simulação de atracamento molecular as soluções putativas foram também filtradas tendo em conta a hidrofobicidade. De facto as características das superfícies de potencial eléctrico das duas proteínas apontam para que a interacção entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂ tenha carácter hidrofóbico.

Para completar a análise de atracamento molecular e comparar com a interacção entre a PCc e o citocromo *c* de cavalo, as soluções putativas com distâncias entre os hemos (hemo E da PCc e hemo do citocromo *c*) inferiores a 20 Å foram filtradas também tendo em conta o carácter electrostático. Na Tabela 5.2, encontra-se o resumo da análise de atracamento molecular tendo em conta os filtros utilizados e o número de soluções válidas das melhores 500 das 5000 geradas pelo BiGGER em diferentes condições.

Tabela 5.2 Análise de atracamento molecular entre a PCc nas diferentes formas e os doadores de electrões, efectuado usando as 500 melhores das 5000 soluções do algoritmo BiGGER.

Peroxidase do citocromo c de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (Alvo)		Doador de electrões (prova)	Melhores soluções das 500 melhores (d<20 Å)		
			Classificação global	Hidrofobicidade	Electrostática
Dimérica	Conformação activa	Citocromo <i>c</i> ₅₅₂			
	(500-contato)		0	0	0
	(300-contato)		2	0	0
inactiva					
(500-contato)	2		0	0	
(300-contato)	2		4	4	
Monomérica	Activa				
	(500-contato)	1	0	0	
	(300-contato)	4	5	5	
	Inactiva				
	(500-contato)	1	0	0	
	(300-contato)	4	5	5	

A análise destas soluções evidência que o programa não encontra nenhum local preferencial de interacção havendo poucas orientações em que será plausível a transferência electrónica. Pelos dados da Tabela 5.2 verifica-se que, considerando somente 300 contactos, entre as quinhentas melhores soluções putativas de atracamento, tendo em atenção que a distância entre os centros férricos (hemo E do dímero de PCc conformação activa e do hemo do citocromo) não deve ser superior a 20 Å [191], não há nenhuma que apresente uma boa classificação global e que favoreça interacções hidrofóbicas. No entanto considerando a forma dimérica da PCc inactiva é possível encontrar algumas soluções de atracamento molecular com características hidrofóbicas.

Na Figura 5.7 estão representados os centros geométricos do dímero da PCc das 500 melhores posições de atracamento molecular, para a classificação global, carácter hidrofóbico e

carácter electrostático do complexo entre o dímero de PCc inactiva e activa e o dímero do citocromo *c*₅₅₂.

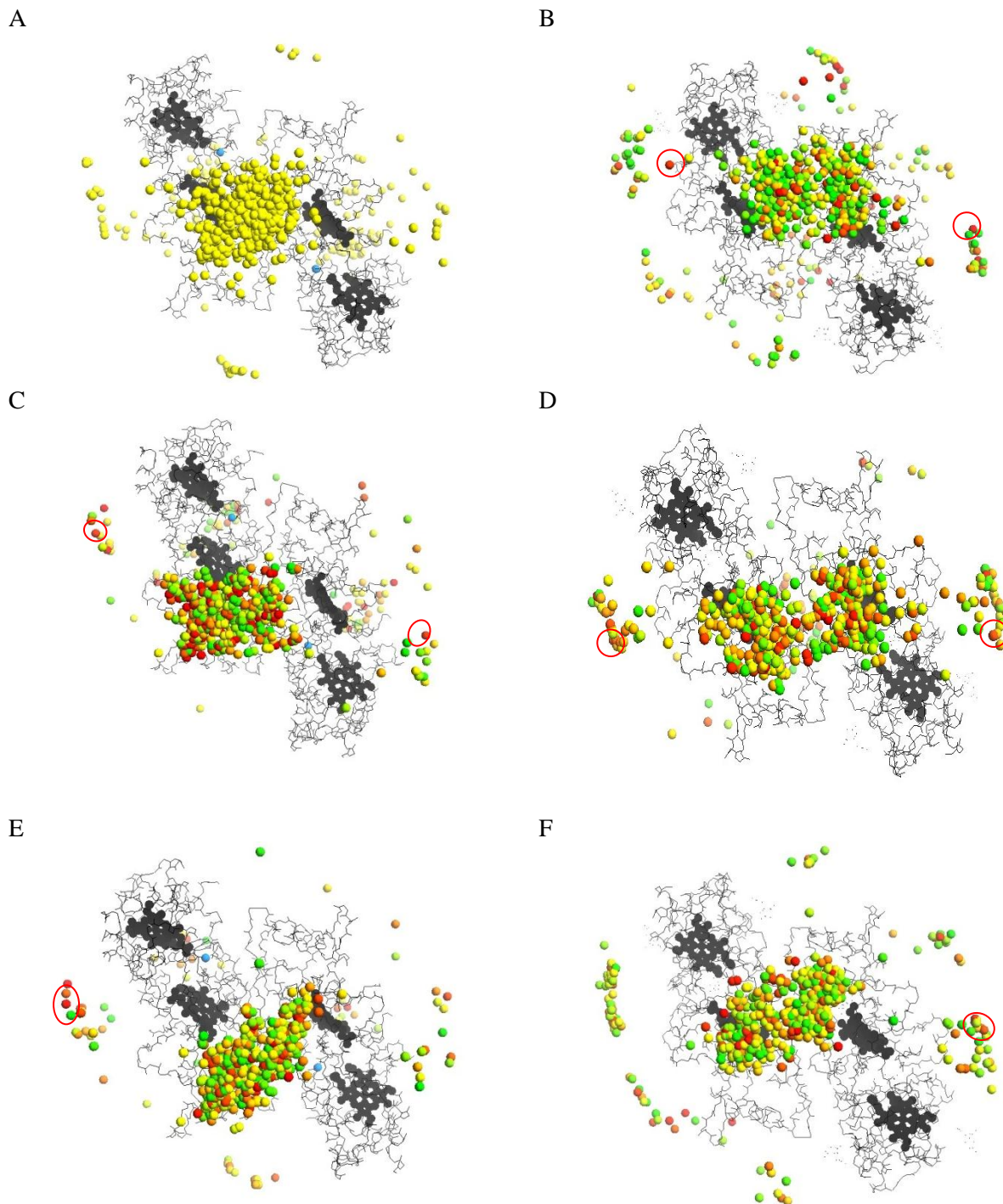


Figura 5.7 Complexo de transferência electrónica entre o dímero da PCc em valência mista (A, C e E) (ID-2827), ou oxidada (B, D e F) (ID- 3498 e ID- 1080) e dímero do citocromo *c*₅₅₂. Representação das quinhentas melhores soluções para o atracamento molecular, encontradas com 300 contactos, pelo critério de classificação global (A, B), de hidrofobicidade (C, D) e interacções electrostáticas (E, F). As figuras foram preparadas usando o programa Chemera. As hipotéticas posições do centro molecular do dímero do citocromo *c*₅₅₂ estão representadas como esferas, à volta de estrutura da PCc. As esferas a vermelho são as que apresentam melhor indexação na característica referida, sendo as verdes as que apresentam pior indexação. As posições que poderão proporcionar a transferência de electrões estão circundadas a vermelho. Os iões cálcio estão coloridos a cor azul claro e os hemos da PCc a preto.

Na Figura 5.7 estão assinaladas as possíveis posições do citocromo *c*₅₅₂ quando forma complexos com a PCc, tendo em conta que por cada dímero de PCc haverá dois dímeros de citocromo *c*₅₅₂ a interagir com a esta.

Na Tabela 5.3, encontram-se os parâmetros das melhores soluções dos modelos de complexos gerados durante o atracamento, para o complexo citocromo *c*₅₅₂: PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, estando as melhores soluções em cada uma das situações a negrito.

Tabela 5.3 Parâmetros das melhores soluções de modelos de complexos obtidos pelo atracamento do doador de electrões (citocromo *c*) na Peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* usando o programa Chemera e o atracamento com o algoritmo BiGGER.

Complexo	ID	Distância* (Å) (ordenação)	Classificação Global (ordenação)	Hidrofobicidade (ordenação)	Interação electrostática (ordenação)
Monómero PCc inactiva- cit <i>c</i>₅₅₂ (300 contactos)	1748	19,1 (12)	3,5 (12)	-4,5 (21)	-10,1 (12)
	3841	19,7 (22)	3,1 (46)	-4,7 (10)	-0,2 (33)
	3017	19,9 (27)	3,1 (38)	-4,4 (13)	+14,3 (41)
	2341	19,6 (18)	2,8 (74)	-6,1 (7)	-12,5 (9)
	116	18,5 (6)	2,7 (97)	-6,0 (9)	-2,7 (17)
Monómero PCc activa – cit <i>c</i>₅₅₂ (300 contactos)	3131	17,2 (1)	2,6 (132)	-4,9 (31)	+0,4 (22)
	1748	19,2 (14)	3,5 (12)	-4,5 (36)	-10,1 (20)
	3841	19,7 (20)	3,1 (46)	-4,7 (19)	-0,2 (21)
	3017	19,9 (24)	3,1 (38)	-4,4 (22)	+14,3 (25)
	116	18,5 (8)	2,7 (97)	-6,0 (17)	-2,7 (29)
Monómero PCc inactiva- cit <i>c</i>₅₅₂ (500 contactos)	3469	18,8 (31)	4,1 (9)	-5,9 (3326)	-22,2 (2988)
Monómero PCc activa– cit <i>c</i>₅₅₂ (500 contactos)	3469	18,7 (28)	0,5 (10)	-5,9 (3326)	-22,2 (497)
	1678	19,5 (42)	0,3 (191)	-5,6 (3692)	-37,9 (1205)
Dímero PCc inactiva – cit <i>c</i>₅₅₂ (300 contactos)	3499	18,6 (3)	2,7 (33)	-6,6 (5)	-26,8 (7)
	3992	19,1 (6)	2,7 (46)	-6,3 (7)	-36,5 (6)
	1080	18,8 (4)	2,5 (125)	-8,3 (1)	-53,9 (1)
	4335	19,5 (8)	2,4 (200)	-5,5 (9)	-25,8 (8)
Dímero PCc activa – cit <i>c</i>₅₅₂ (500 contactos)	Não há soluções que cumpram o critério de distância menor do que 20 Å entre hemo E da PCc e o hemo do cit <i>c</i>₅₅₂				
Dímero PCc inactiva – cit <i>c</i>₅₅₂ (500 contactos)	4980	17,6 (1)	2,2 (397)	-6,8(1560)	-25,2 (3276)
	1016	18,3(2)	2,4 (127)	-7,3 (1094)	-24,1 (3386)
	3498	18,6(3)	2,7 (33)	-6,6(1789)	-26,8 (3145)
	1080	18,6(4)	2,1 (460)	-8,3 (386)	-53,9 (743)
	1419	19,0(5)	2,2 (343)	-7,2 (1179)	-52,0 (867)
	3991	19,1(6)	2,7 (48)	-6,3 (1343)	-36,5 (2268)
Dímero PCc activa – cit <i>c</i>₅₅₂ (300 contactos)	2827	19,2 (1)	1,9 (2761)	-6,6 (1426)	-50,9 (1337)
	3586	20,5 (2)	1,9 (4708)	-5,0 (3371)	-44,9 (1858)

*Distância entre o hemo E da PCc e o hemo do citocromo *c*₅₅₂

Das soluções obtidas pela simulação de atracamento molecular (Tabela 5.3) foram seleccionadas duas (Figura 5.8) tendo em conta a distância requerida para que ocorra transferência electrónica e o carácter hidrofóbico do complexo. Nestas duas estruturas o metilo M4 do citocromo *c*₅₅₂ está próximo do hemo E da PCc o que é compatível com os dados obtidos por espectroscopia de ¹H-RMN.

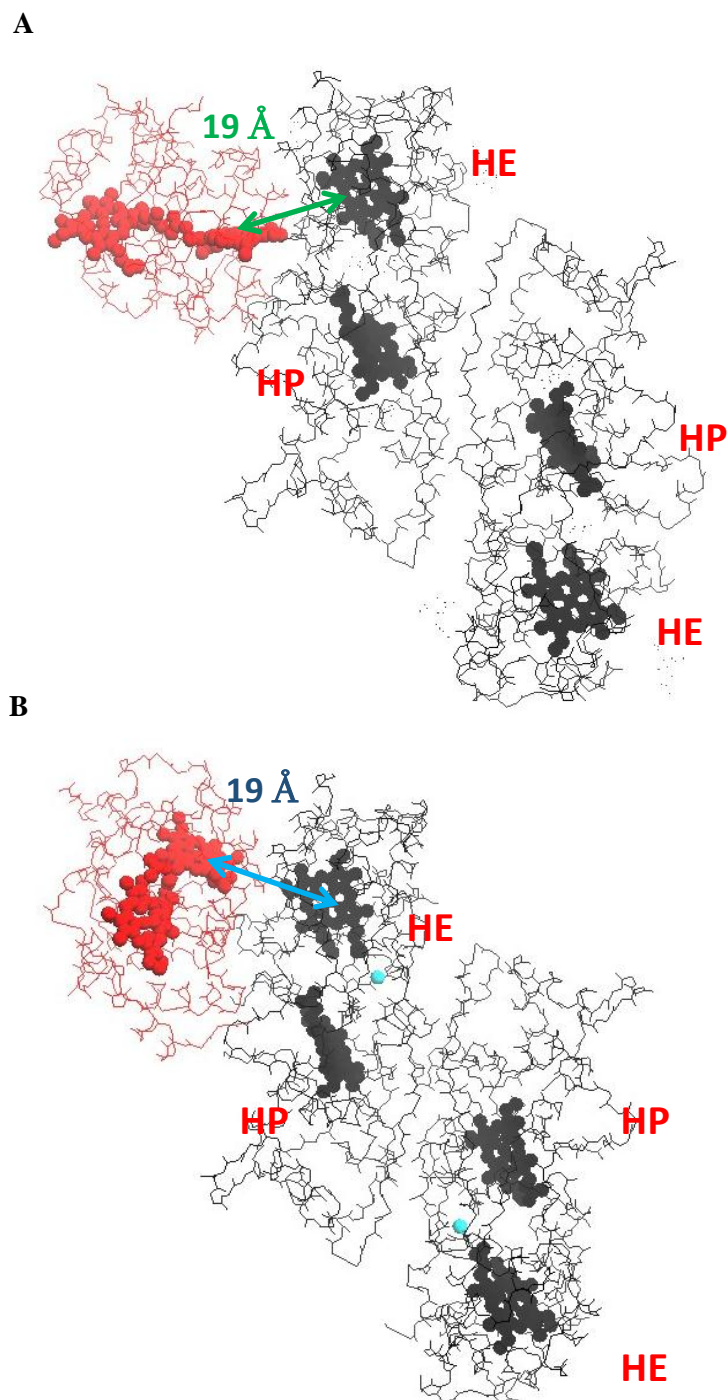


Figura 5.8 As estruturas das duas melhores soluções de atracamento molecular entre o dímero de PCc (A) na forma inactiva (ID 3498) e (B) na forma activa (ID-2827) e o dímero do citocromo *c*₅₅₂. A distância entre o ferro hémico do hemo E (HE) da PCc em valência mista e o centro com ferro hémico do citocromo *c*₅₅₂ na estrutura ID-2827 é 19 Å, sendo a distância entre o hemo E da PCc na forma oxidada e o centro com ferro hémico do citocromo *c*₅₅₂ na estrutura ID-3498 de 19 Å. A estrutura da PCc apresenta-se com cor preta tal como os hemos, o citocromo apresenta-se com a cor vermelha tal como o hemo e o ião cálcio apresenta-se a azul. As figuras foram preparadas utilizando o programa Chemera.

Tendo em conta estes resultados podemos concluir que estamos perante transferências de electrões entre o hemo E do dímero de PCc e o hemo do citocromo *c*₅₅₂ a longas distâncias

(> 10 Å). As transferências de electrões entre proteínas são controladas pela dinâmica molecular, pelo solvente, pelos aminoácidos que estão entre os centros redox e pela orientação relativa e afastamento entre os grupos prostéticos [256- 258, 260- 264]. Verifica-se nesta simulação computacional que a distância entre os hemos (hemo E do dímero de PCc e o hemo do citocromo *c*₅₅₂) e o carácter hidrofóbico serão os factores que mais influenciaram a transferência de electrões no complexo formado pela PCc e pelo citocromo *c*₅₅₂. Propõe-se que a transferência de electrões entre estes centros redox, nestas condições ocorra por “electron tunneling” tal como se reportou para outros centros redox [191].

O facto de terem sido encontradas poucas soluções putativas pelo programa de simulação de atracamento molecular BiGGER levanta a questão da sua validade. Este resultado pode dever-se ao facto do programa ter sido optimizado com um número muito pequeno de complexos transientes (o programa baseia-se numa rede neuronal) [200, 201]. Ou também poderá ser explicado pelo facto das estruturas de PCc utilizadas não serem as formas fisiológicas da proteína a pH 7,5. De lembrar que a estrutura em valência mista da PCc de *Pa. pantotrophus* que é a peroxidase com maior homologia estrutural com a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* é ligeiramente diferente desta, o que reforça a ideia de que a estrutura 1HRZ5 não é forma activa da enzima [53].

ii) Complexo citocromo *c* de cavalo e PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus*

As soluções de atracamento molecular entre a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e o citocromo *c* de cavalo foram também analisadas tendo em conta a classificação global, a interacção electrostática e a hidrofobicidade. Em investigações anteriores, Alves e colaboradores [70] já tinham reportado que entre o citocromo *c*₅₅₂ e a PCc a interacção era predominantemente electrostática o que levou à seriação de soluções carácter electrostático (Tabela 5.4). No entanto e dado que não se encontravam soluções pelo critério anterior (carácter electrostático), procedeu-se à análise de soluções pelo carácter hidrofóbico.

Seguidamente apresenta-se os resultados da análise de atracamento molecular entre a PCc e o citocromo *c*, Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Análise de atracamento molecular entre a PCc nas diferentes formas e o citocromo *c* de cavalo efectuado usando as 50 melhores das 5000 soluções do algoritmo BiGGER.

Peroxidase do citocromo <i>c</i> de <i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> (Alvo)		Doador de electrões (prova)	Melhores soluções das 500 melhores (d < 20 Å)		
			Classificação global	Hidrofobicidade	Electrostática
Dimérica	Inactiva (300)	Citocromo <i>c</i> de coração de cavalo	1	2	0
	Activa (300)		1	0	0
monomérica	Inactiva (300)		5	5	0
	Activa (300)		8	5	0

A análise de resultados mostrou que poucas são as soluções de atracamento molecular em que a distância entre os hemos é inferiores a 20 Å (Tabela 5.5). Na sua maioria estas soluções localizam-se entre os monómeros da PCc, local que não é apropriado para a transferência electrónica (Figura 5.9).

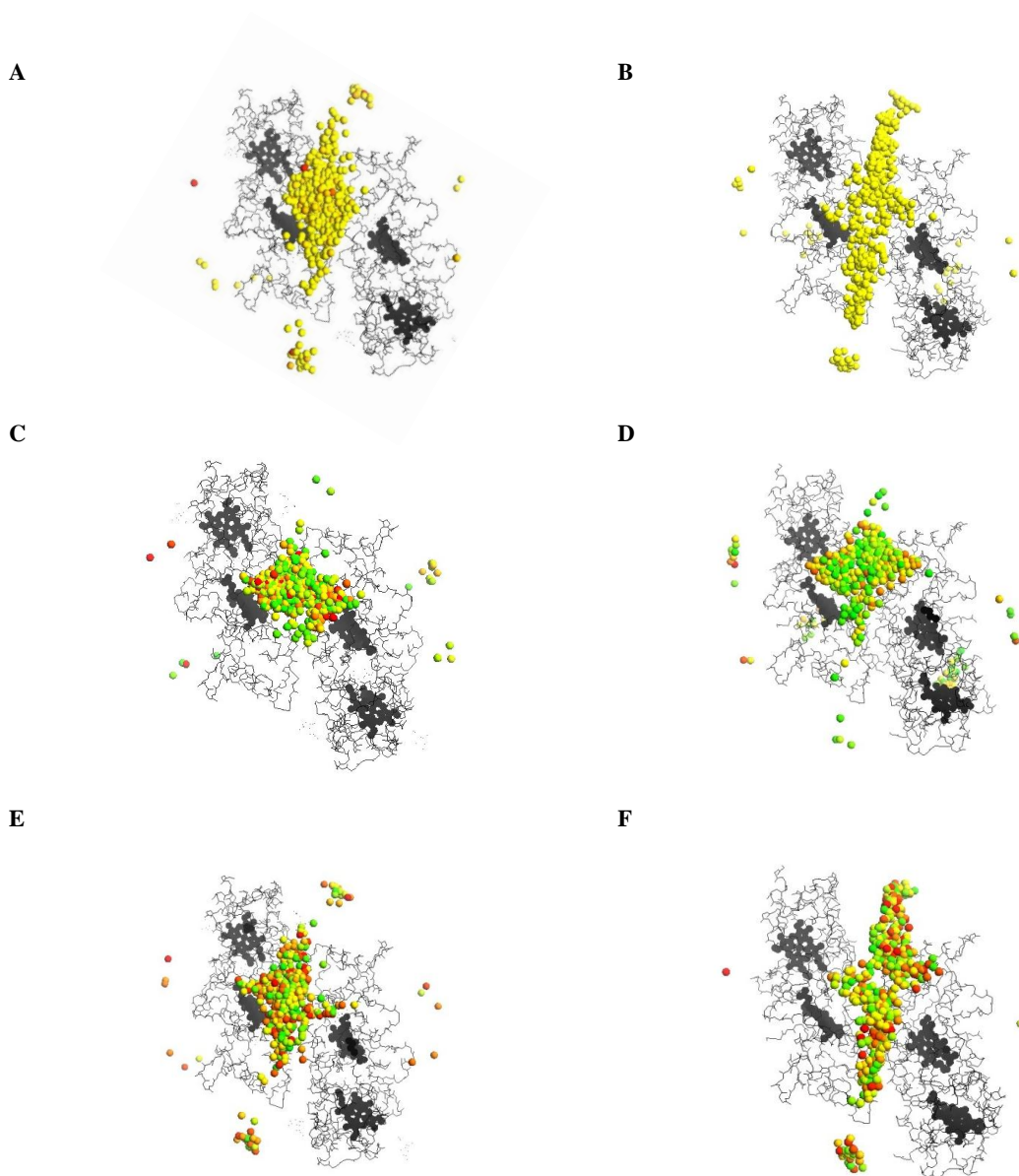


Figura 5.9 Complexo de transferência electrónica entre o dímero da PCc na forma inactiva e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global (A), a hidrofobicidade (C) e as interações electrostáticas (E) respectivamente e o dímero da PCc na forma activa e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global, a hidrofobicidade e as interações electrostáticas (B), (D) e (F), respectivamente. Representação das quinhentas melhores soluções para o atracamento molecular encontradas com 300 contactos. Figuras preparadas usando o programa Chemera. As hipotéticas posições do centro molecular do citocromo *c* de cavalo estão representadas como esferas. As esferas a vermelho são as que apresentam melhor indexação na característica referida, sendo as verdes as que apresentam pior indexação.

Tabela 5.5 Parâmetros das melhores soluções de modelos de complexos obtidos pelo atracamento da Peroxidase do citocromo *c* de *Ma. hydrocarbonoclasticus* com o citocromo *c* de cavalo usando o programa Chemera e o atracamento molecular com o algoritmo BiGGER.

Complexo	ID	Distância (Å)	Classificação Global (ordenação)	Hidrofobicidade (ordenação)	Interacção electrostática (ordenação)
Dímero PCc inactiva – cit <i>c</i> de cavalo (300 contactos)	1861	19,9 (3)	2,4 (1)	-7,1 (227)	-85,1 (3822)
	4726	16,6 (1)	1,9 (1067)	-5,6 (761)	-90,7 (3563)
	4841	16,7 (2)	1,9 (1068)	-4,8 (1232)	-86,7 (3758)
Dímero PCc activa – cit <i>c</i> de cavalo (300 contactos)	4318	19,1 (1)	19 (1042)	-8,9 (18)	-133,1 (1454)
	3143	19,2 (2)	2,4 (5)	-8,2 (32)	-51,2 (4690)
	1561	19,9 (3)	1,9 (1043)	-7,3 (116)	-107,7 (2813)

As soluções obtidas em que a distância é inferior a 20 Å poderão ser as orientações que as duas proteínas adoptam no complexo de baixa força iónica (única condição em que se observa a catálise, Capítulo 4).

Na figura 5.10 encontram-se as duas posições de atracamento molecular que melhor representam os complexos que se poderão formar entre a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* dimérica e o citocromo *c* de cavalo. Em ambas a distância é propícia à transferência de electrões.

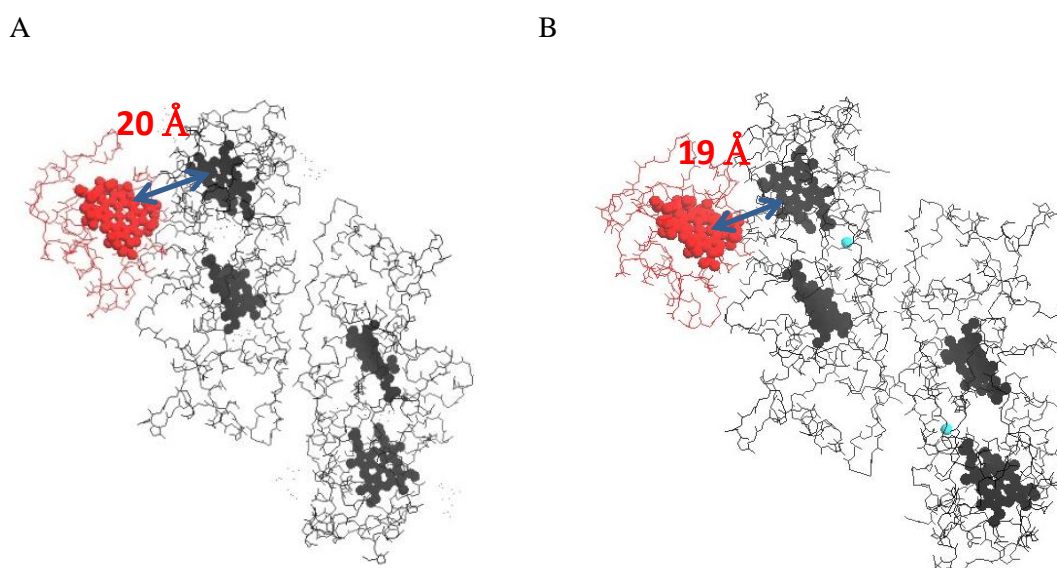


Figura 5.10 Representação melhor solução para o complexo de transferência electrónica entre (A) o dímero da PCc na forma inactiva e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global, a hidrofobicidade e as interacções electrostáticas (ID-1861) e (B) entre o dímero da PCc na forma activa e o citocromo *c* de cavalo, tendo em conta a classificação global, a hidrofobicidade e as interacções electrostáticas (ID- 4318). Soluções de atracamento molecular das obtidas com 300 contactos. Figuras preparadas usando o programa Chemera. O citocromo *c* de cavalo está representado a vermelho e a PCc a preto. Os iões cálcio estão coloridos a azul claro.

5.3 Conclusão

A análise do complexo transiente entre os citocromo *c* e a PCc efectuou-se por duas metodologias distintas, a titulação do citocromo *c*₅₅₂ pela PCc seguida por ¹H-NMR e a simulação por atracamento molecular com o algoritmo BiGGER.

A formação do complexo transiente de baixa afinidade entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂, não causou grandes alterações no espectro de ¹H-RMN do citocromo *c*₅₅₂. Com base nos resultados obtidos nestes ensaios e na estrutura molecular do citocromo *c*₅₅₂ foi proposto que o metilo M4 do citocromo *c*₅₅₂ seja o metilo 1-CH₃ porque se encontrar mais exposto ao solvente, pelo que na formação do complexo com a PCc será o mais afectado. A constante de dissociação encontrada sugere que este complexo transiente é fraco, destaca-se porém que os resultados não foram obtidos nas condições fisiológicas, em que o complexo se forma entre o citocromo *c*₅₅₂ reduzido e a PCc oxidada, podendo esta constante ser ilusória. De facto as elevadas velocidades de catálise encontradas no Capítulo 4|, sugerem a formação de um complexo competente para a transferência de electrões entre as duas proteínas, sendo a constante de transferência intermolecular encontrada semelhante às obtidas entre este citocromo e outras enzimas, que apresentam constantes de dissociação menores [167, 166].

Pela análise das soluções obtidas no atracamento molecular entre PCc e Cit *c*₅₅₂, verifica-se que na interface entre ambas as proteínas há complementaridade de forma, e a distância necessária à transferência de electrões havendo no entanto poucas posições prováveis entre os dois parceiros. As melhores posições de atracamento localizam-se nas proximidades do hemo E da PCc. A hidrofobicidade da superfície do citocromo *c*₅₅₂ nas vizinhanças do metilo M4 e as características maioritariamente apolares (não há resíduos carregados nas proximidades do metilo exposto do hemo E) ou hidrofóbicas da superfície PCc, sugerem que as suas interacções serão maioritariamente hidrofóbicas e ocorram na vizinhança desse metilo.

Uma questão permanece por responder: Qual a relevância fisiológica destes resultados?

Considerando que as estruturas do PDB serão as fisiológicas, as vizinhanças do hemo E ficam praticamente inalteradas durante a sua redução, como se explica então que os potenciais formais encontrados por espectroscopia de UV-visível, para este hemo, sejam ligeiramente diferentes na presença (forma activa) e na ausência (forma inactiva) de iões cálcio? Estes resultados de atracamento molecular sugerem que a estrutura encontrada a pH 5,3 poderá não ser a forma fisiológica activa da PCc a pH 7,5, mas uma intermédia entre a forma fisiológica inactiva (pH 4,5) e a fisiológica activa (pH 6 a 7,5). A estrutura activa deverá ser semelhante à encontrada para a PCc em valência mista de *Pa. pantotrophus* (2C1V) [53], de *Rb. capsulatus* [65] e de *Ps aeruginosa* (2VHD) [43], cuja vizinhança do hemo E apresenta ligeiras alterações quando se compara a forma oxidada e a de valência mista [53].

Por outro lado, como o domínio de transferência de electrões praticamente não se altera (hemo E), nas duas estruturas utilizadas no atracamento molecular [53, 71], o local de ligação encontrado por este método será o esperado entre a forma inactiva da PCc e o citocromo *c*₅₅₂, num complexo fisiológico não competente cineticamente.

Tal como era espectável pela análise resultados obtidos no capítulo 4|, a interacção entre o citocromo *c* de cavalo e a PCc ocorre em condições muito restritas o que se verificou na simulação de atracamento molecular.

6.1 Conclusão final

Para se defender das espécies radicais de oxigénio (ERO) os organismos vivos têm três níveis de defesa, o primeiro consiste em evitar que estas se formem, o segundo é a eliminação destas quando já se formaram por mecanismos enzimáticos ou não, e o terceiro é reparar os danos causados pelas mesmas. A utilização da peroxidase do citocromo *c* pelos organismos vivos enquadra-se no segundo nível de defesa.

O principal objectivo deste trabalho foi caracterizar a PCc de *Ma. hydrocarbonoclasticus* e o seu complexo de transferência electrónica com o seu parceiro fisiológico, o citocromo *c*₅₅₂. Para essa finalidade foram utilizadas diferentes técnicas (espectroscopia UV-visível, espectroscopia ¹H-RMN, espectroscopia de RPE, voltametria cíclica e voltametria de impulso diferencial) e metodologias.

A bactéria *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi crescida em condições de microaerofilia, verificando-se que esta condição foi essencial para a sobreexpressão da PCc, tendo-se proposto com base em evidências experimentais obtidas neste trabalho e pela primeira vez que, o FNR desempenhe o papel de activador transcripcional do gene *ccp* nesta bactéria. O peróxido de hidrogénio, substrato da PCc e precursor de espécies reactivas de oxigénio, é normalmente formado pela dismutação do superóxido (espécie gerada em condições de hipoxia), ou como produto da actividade de oxidases terminais em condições de microaerofilia. Será a presença do peróxido de hidrogénio, resultado da actividade das oxidases terminais de *Ma. hydrocarbonoclasticus*, que ativará o FNR.

A PCc *Ma. hydrocarbonoclasticus* foi purificada na forma dimérica (resultados de cromatografia de exclusão molecular e ¹H-RMN), mantendo-se esta estrutura quaternária a elevada força iónica a pH 7,5.

As diferentes técnicas utilizadas, neste trabalho de investigação, permitiram estudar o mecanismo de activação da PCc, verificando que este se inicia sempre com a redução do hemo E. Os iões cálcio mostraram-se essenciais somente para a activação da enzima a pH 7,5. A pH entre 5,5 e 7,0, a activação ocorre sem necessidade de excesso de iões cálcio, no entanto continua a ser necessário a redução do hemo E, para que ocorra alteração do estado de spin do hemo P. O facto de a pH 7,5 o mecanismo de activação ser dependente do ião cálcio, possibilita a distinção entre dois processos: o primeiro é a redução do hemo E e o segundo são as alterações estruturais consequentes, devido à presença de ião cálcio. Verifica-se que este ião é o responsável pelas alterações estruturais da PCc em valência mista detectadas a pH 7,5 por RPE e ¹H-RMN, no entanto os resultados obtidos neste trabalho de investigação não permitem clarificar qual a função deste ião na activação. Neste contexto, e tendo em conta as estruturas das várias peroxidases do citocromo *c* bacterianas conhecidas, é possível afirmar que o ião cálcio estabiliza a estrutura terciária e a quaternária destas proteínas, e permite que a

conformação ativa fique estável, favorecendo assim a realização da catálise. De facto todas as estruturas de PCc em valência mista conhecidas, apresentam um íon cálcio entre os domínios do hemo E e do hemo P, mesmo aquelas em que se verifica que a actividade catalítica é independente da presença de excesso de íon cálcio [53, 80].

Verificou-se pelos estudos de espectroscopia de UV-visível (pH 7,5, 295 K) e de ^1H -RMN (pH 7,5, 303 K), que durante a activação, o hemo P fica em spin-alto (surge a banda a 630 nm nos espectros de UV-visível e verifica-se um desvio das ressonâncias dos prótons metálicos ligados ao hemo para campo baixo), o que permite inferir que este se encontra pentacoordenado. No entanto em estudos de RPE (pH 7,5, 8 K) e após redução do hemo E, verificou-se que o hemo P permaneceu em spin-baixo, o que sugere que a baixa temperatura este se encontra coordenado com uma molécula de água, que a baixa temperatura tem características de ligando forte.

O processo de activação exhibe características de efeito redox-Bohr, ocorrendo alterações conformacionais só após a alteração do estado redox do hemo E. Estas modificações estruturais estão associadas a processos de protonação, provavelmente dos grupos propiónicos hémicos que fazem par iónico com uma histidina o que origina novas redes de ligações por pontes de hidrogénio e simultaneamente alterações conformacionais. Este mecanismo de activação envolve, *in vivo*, o parceiro fisiológico, o citocromo c_{552} , que fornece os electrões necessários à redução prévia do hemo E.

Os resultados obtidos neste trabalho de investigação permitiram identificar algumas ideia-chave relativas à activação da PCc:

- A enzima na forma nativa apresenta uma estrutura quaternária dimérica a pH 7,5 (dados de cromatografia de exclusão molecular e ^1H -RMN);
- O hemo E necessita de ser reduzido para que ocorra activação da PCc;
- O estado de spin do hemo P pode ser alterado, após redução do hemo E, sem necessitar de excesso de íões cálcio entre pH 5,5 e 7,0;
- O único pH onde os dois passos do mecanismo de activação (redução e alteração estrutural provocado pelo íon cálcio) são distinguíveis é 7,5;
- A pH 7,5 o potencial formal do hemo P é pouco afectado pela presença de excesso de íon cálcio;
- A pH 7,5 o potencial formal do hemo E é ligeiramente afectado pela presença de excesso de íon cálcio: O potencial formal é mais alto (+ 190 mV/+ 230 mV) em presença de íões cálcio, sugerindo que a sua redução ocorre mais facilmente quando este está em equilíbrio de spin;
 - A pH 7,5 a diferença entre o potencial formal do hemo E na presença e na ausência de excesso de íon cálcio é de aproximadamente 100 mV, o que sugere que a presença de íon cálcio influenciará a conformação da PCc nas vizinhanças do hemo E tornando-o

mais acessível para trocar electrões com um doador. Esta diferença entre potenciais formais revela que as modificações nas proximidades do hemo E são em maior número que as descritas por Dias e colaboradores [71].

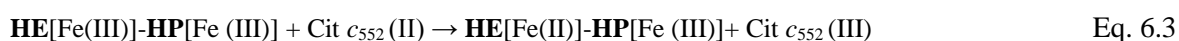
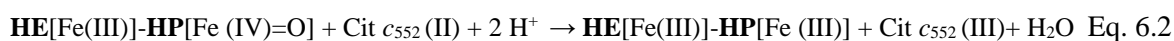
Na Tabela 6.1 resumem-se as principais características espectroscópicas desta enzima.

Tabela 6.1 Características espectroscópicas da PCc de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, pH 7,5.

Estado redox da PCc	Hemo E (hemo transferidor de electrões)	Hemo P (Hemo peroxidáctico ou catalítico)
Técnicas		
Oxidada (nativa)	Hemo oxidado Coordenação His-Fe(III)-Met(hexa)	Hemo oxidado Coordenação His-Fe(III)-His
UV-visível	Banda a 630 nm (spin-alto \rightleftharpoons spin-baixo)	(spin-baixo)
^1H -RMN	63,6- 55,3 ppm (spin-alto \rightleftharpoons spin-baixo)	33,8-22,5 ppm (spin-baixo)
RPE	$g_z = 3,39$ (spin-baixo)	$g_{\text{max}} = 2,96$ (spin-baixo)
Oxidada com Ca^{2+}	Hemo oxidado Coordenação His-Fe(III)-Met(hexa)	Hemo oxidado Coordenação His-Fe(III)-His
UV-visível	Banda a 630 nm (spin-alto \rightleftharpoons spin-baixo)	Banda a 630 nm (spin-baixo)
^1H -RMN	63,7- 56,0 ppm (spin-alto \rightleftharpoons spin-baixo) ~ 85 ppm (Met)	34,2-22,1 ppm (spin-baixo)
Valência mista sem Ca^{2+}	Hemo reduzido Coordenação His-Fe(II)-Met(hexa)	Hemo oxidado Coordenação His-Fe(III)-His
UV-visível	Ausência de banda a 630 nm (spin-baixo) Banda α (523 nm) e banda β (556 nm) Apresentam a mesma intensidade	Ausência de banda a 630 nm (spin-baixo)
RPE	Forma ferrosa-diamagnética	$g_{\text{max}} = 2,96$ (spin-baixo)
Valência mista com Ca^{2+}	Hemo reduzido Coordenação His-Fe(II)-Met (hexa)	Hemo oxidado Coordenação His-Fe(III)-His
UV-visível	Banda α (523 nm) e banda β (556 nm) Apresentam a mesma intensidade	Banda a 630 nm (spin-alto)
^1H -RMN	35 ppm (pouco definido) spin-alto	62,8-51,5 (spin-alto)
RPE	não surge (espécie na forma ferrosa- diamagnética)	$g_z = 2,94$ (spin-baixo) $g_z = 2,80$ (spin-baixo)
Reduzida sem Ca^{2+}	Hemo reduzido	Hemo reduzido
UV-visível	Banda β (523 nm) e banda α (556 nm) A banda α . é mais intensa que a β Ausência de banda a 630 nm (spin-baixo)	
Reduzida com Ca^{2+}	Hemo reduzido	
UV-visível	Banda β (523 nm) e banda α (556 nm) A banda α é mais intensa que a β . Banda a 630 nm (spin-alto)	

Os resultados da potenciometria reforçam a hipótese de que a estrutura cristalina obtida por Dias e colaboradores (pH 5,3) [71] possa ser uma das estruturas fisiológicas possíveis, mas intermédia entre a forma fisiológica inactiva (pH 4,5) e a fisiológica activa.

Pós a activação, a enzima dimérica em valência mista está pronta para realizar a redução do peróxido. Este processo pode ser esquematizado, pelas equações 6.1, 6.2 e 6.3, onde **HE**[Fe (II)]-**HP**[Fe(III)] representa o monómero das PCc que interage com o citocromo *c*₅₅₂:



Pretendeu-se utilizar as técnicas de voltametria cíclica e de impulso diferencial para detectar e caracterizar espécies de PCc intermediárias que se formam durante a reacção de catálise do peróxido de hidrogénio a água. Verificou-se no entanto que a enzima sofre alterações estruturais, provocadas aparentemente pelo campo eléctrico gerado nas proximidades do eléctrodo, ficando numa conformação não nativa. Este facto impossibilitou a detecção e caracterização de intermediários, o estudo da transferência intramolecular e da catálise directa por esta técnica.

Efectuou-se então uma caracterização da transferência intermolecular estudando a catálise da peroxidase do citocromo *c* mediada pelo citocromo *c*₅₅₂ e analisou-se possíveis estruturas do complexo transiente formado entre a peroxidase de citocromo *c* e o seu parceiro fisiológico. Os resultados obtidos com técnicas electroquímicas não permitiram uma extrapolação para as condições *in vivo*, tal como foi discutido no Capítulo 4|.

A constante de transferência intermolecular encontrada para o complexo entre a PCc:citocromo *c*₅₅₂, obtida por espectroscopia de UV- visível, $(8,0 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, reflecte a existência de um local de ligação, que poderá ser o local de transferência de electrões encontrado pelo atracamento molecular (Figura 5.8). Os valores de pK_{a1} ($5,5 \pm 0,1$) e pK_{a2} ($8,5 \pm 0,1$) atribuídos aos grupos propionatos ou à histidina 261 e à histidina 71 ou ao glutamato 117 respectivamente, reforçam a importância dos propionatos e das histidinas na alteração estrutural da enzima, após a redução do hemo E e dos segundos (His 71 e Glu117) para a quebra da ligação O-O do peróxido. A histidina 261 encontra-se nas proximidades do hemo E e do ião cálcio, sendo um dos resíduos conservados em todas as PCc, Figura 1.4. Esta histidina é um dos resíduos assinalados por Echalié e colaboradores, como sendo fazendo parte da alteração conformacional nas proximidades do hemo E, aquando da activação das PCc bacterianas [53].

Com o aumento da força iónica verifica-se uma ligeira diminuição da actividade enzimática que no entanto se mantém a elevada força iónica. O complexo formado entre ambas as proteínas será provavelmente governado por forças hidrofóbicas.

Também os resultados de atracamento molecular, realizado com as estruturas da PCc do PDB, apresentam poucas soluções com boas orientações compatíveis com transferência de electrões entre o citocromo *c*₅₅₂ e a PCc. As estruturas quaternárias das duas proteínas não permitem que hajam muitas orientações com complementaridade de forma o que aumenta a distância entre os centros hémicos e dificulta a transferência de electrões. Acresce ainda que no complexo entre ambas as proteínas, o dímero de PCc terá que interagir simultaneamente com dois dímeros de citocromo *c*₅₅₂, o que dificulta ainda mais a ocorrência da transferência de electrões- o complexo formado apresenta a estequiometria 1:1 (1 monómero PCc: 1 dímero de cit *c*₅₅₂). Este complexo caracteriza-se por uma constante de formação típica de complexo transitório, que facilmente se dissocia, sendo sensível à força iónica mas governado por interacções hidrofóbicas, tal como foi anteriormente referido.

Com base nos dados experimentais foi proposto um modelo para a formação do complexo entre a PCc e o citocromo *c*₅₅₂, que descreve seguidamente:

- 1) Inicialmente as duas proteínas aproximam-se: o citocromo *c*₅₅₂, liga-se à superfície da PCc, mas fica livre para se mover na sua superfície. Para que este complexo se forme, a proteína redox solvatada (o citocromo *c*₅₅₂) é pré-orientada por forças electrostáticas globais para a enzima, a PCc. O citocromo pode mover-se livremente na superfície da PCc, o que lhe permite encontrar a melhor posição e a superfície hidrofóbica complementar que permita uma transferência de electrões eficaz entre si e a PCc.
- 2) O citocromo *c*₅₅₂ liga-se nas proximidades do hemo de transferência electrónica da PCc. Após encontrar este local, o citocromo *c*₅₅₂, forma o complexo reactivo com a PCc onde as águas de solvatação da superfície se afastam para permitir a aproximação das duas superfícies que vão interagir. No caso do complexo PCc:citocromo *c*₅₅₂, as superfícies complementares deverão ter características hidrofóbicas uma vez a actividade se mantém a elevada força iónica. Os hemos que interagem (hemo transferidor de electrões da PCc e hemo do *c*₅₅₂) distam entre si aproximadamente 19 Å (distância encontrada através da estrutura do complexo obtida pelo atracamento molecular).

6.2 Perspectivas futuras

Os resultados apresentados neste trabalho de investigação permitiram validar algumas das hipóteses apresentadas relativamente ao mecanismo de activação e de catálise das PCc. No entanto, tanto os estudos de atracamento molecular como os estudos com espectroscopia do visível a pH 4,5, levantaram novamente as dúvidas, sobre as estruturas tridimensionais publicadas no PDB serem as formas fisiológicas activas e inactivas da PCc. Por outro lado, o

facto das estruturas terem sido obtidas em condições não fisiológicas (pH 4,0 e pH 5,3) e da redução do hemo E não ter ocorrido em presença de ascorbato de sódio durante a cristalização, permite a sugestão destas não serem as formas fisiológicas, uma vez que a PCc é reduzida por ascorbato em presença de DAD a pH 4,5. Para responder a estas questões será essencial obter uma estrutura tridimensional, a pH fisiológico tanto da enzima no estado oxidado como no estado de valência mista.

A titulação potenciométrica bem como a determinação da massa molecular da PCc deverá ser efectuada a pH 6,0 na presença e na ausência de cálcio, para se verificar se os hemos mantêm as características encontradas neste trabalho a pH 7,5.

A utilização de eléctrodos de ouro ou carbono vitreo modificados, poderá ser útil para o estudo da catálise directa das PCc, uma vez que poderá levar à caracterização de espécies intermediárias formadas na catálise.

Uma vez que a PCc pertence a uma bactéria marinha, que consegue desenvolver a via metabólica da desnitrificação, será também importante perceber se a única função desta enzima é catalisar a redução do peróxido de hidrogénio a água, ou se pelo contrário consegue reduzir o peroxinitrito (ONOO^-) a nitrito e água. O peroxinitrito pode ter origem na reacção entre o óxido nítrico e o radical superóxido e é uma ERO que normalmente é reduzido pelas reductases do nitrato, durante o processo de desnitrificação [91]. Actualmente coloca-se a hipótese de bactérias anaeróbias possuírem uma classe de reductases, que no início da evolução destes organismos e em presença de uma atmosfera primordial anóxica, tenham usado o nitrato, nitrito ou óxido nítrico como substrato e que tenham evoluído no sentido de serem capazes de utilizar outras ERO, como o peróxido de hidrogénio, como substrato [266, 267]. A realização da catálise do peroxinitrito pela PCc, poderá ser uma confirmação da existência desta classe de reductases, como antepassado comum das PCc e das reductase do nitrito [1] e a explicação para ambas serem reguladas pelo FNR.

BIBLIOGRAFIA

- 1 **Falkowski, P., Godfrey, L.** (2008) "Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle" *Phil. Trans. R. Soc. B.* **363**, 2705.-2716.
- 2 **Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, et al.** (2010) "Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria" *Nature* **464**, 543.
- 3 **Halliwell, B.**, (2007) "Biochemistry of oxidative stress." *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1147.
- 4 **Halliwell, B., Clement, M., Long, L.** (2000) "Hydrogen peroxide in the human body." *FEBS Lett.* **486**, 10.
- 5 **Cadenas, E.** (1998) "Mechanisms of Antioxidant Action." in Free Radicals, oxidative stress, and antioxidants, Ozben, ed. Plenum Press.
- 6 **Jamieson, D. J.** (1998) "Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**, 1511.
- 7 **Oktyabrsky, O., Smirnova, G.** (2007) "Redox regulation of cellular functions." *Biochemistry (Moscow)* **72**, 132.
- 8 **Forman, H.** (2007) "Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction." *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 926.
- 9 **Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., Mager, W.** (1996) "The molecular defences against reactive oxygen species in yeast." *Mol. Microbiol.* **19**, 651.
- 10 **Livingstone, D.** (2001) "Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms." *Marine Pollution Bulletin* **42**, 656.
- 11 **Pinto, E., Sigaud-Kutner, S., Leitão, M., Okamoto, O., Morse, D., Colepicolo, P.** (2003). "Heavy metal induced oxidative stress in algae." *Journal of Phycology*, **39**: 1008.
- 12 **Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J.** (2000) "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species". *Int Microbiol.* **3**, 3.
- 13 **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.** (1984) "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem. J.* **219**
- 14 **Fridovich, I.**, (1998) "Oxygen toxicity: a radical explanation." *J. Exp. Biol.* **201**, 1203
- 15 **Halliwell, B.** (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." *Plant Physiology* **14**, 312 – 322
- 16 **Gamaley, I., Klyubin, I.** (1999) "Roles of reactive oxygen species: function and regulation of cellular functions." *Int. Rev. Cytol.* **188**, 203.
- 17 **Scandalios, J. C.** (2005). "Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 995.
- 18 **Vranova E, Inze D, Breusegem FV** (2002). "Signal transduction during oxidative stress." *Journal of Experimental Botany* **53**, 1227.
- 19 **Costa, V., Amorim, M., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P.** (2002) "Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators YE1 and Skn7." *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1507.
- 20 **Cooke, M., Evans, M., Dizdaroglu, M., Lunec, J** (2003) "Oxidative DNA damage: mechanism, mutation, and disease" *FASEB journal*, **17**, 1195.
- 21 **Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullas, M.** (2006) "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64** 178.
- 22 **Imlay, J.** (2003) "Pathways of oxidative damage." *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395.

- 23 Toledano, M., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., Azevedo, D. (2003) "Oxidative stress responses in yeast." In *Topics in Current Genetics*, Springer-Verlag.
- 24 Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P. (2007) "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 722.
- 25 Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F., Toledano, M., (2006) "The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways." *J. Biol. Chem.* **281**, 10420.
- 26 Kehrer, J., (2000), "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity." *Toxicology* **149**, 43
- 27 Van Vliet, A., Ketley, J., Park, S., Penn, C. (2002) "The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense" *FEMS Microbiology Reviews* **26**, 173.
- 28 Stainer, R., Palleroni, N. e Doudoroff, M., (1966) "The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study." *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159.
- 29 Plakunov, V., Shelemekh, O. (2009) "Mechanism of oxygen regulation in microorganisms." *Microbiology* **78**, 535.
- 30 Denis, M., Arnaud, S., Malatesta, F. (1989) "Hydrogen peroxide is the end product of oxygen reduction by the terminal oxidase in the marine bacterium *Pseudomonas nautical* 617" *Febs Letters*, **247**, 475.
- 31 Otten, M., Stork, M., Rijnders, W., Westerhoff, H., Van Spaning, M. (2001) "Regulations of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*" *Eur. J. Biochem.* **268**, 2486.
- 32 Silva, M., Gaspar, J., Silva, I., Leão, D., Rueff, J. (2003) "Mechanism of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells" *Mutagenesis*, **18**, 491.
- 33 Oliveira-Marques, V., Cyrne, L., Marinho, H., Antunes, F. (2007) "A quantitative study of NF- κ B activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF- α ." *J. Immunol.* **178**, 3893
- 34 Besson, S., Carneiro, C., Moura, J., Moura, I., Fauque, G. (1995), "A cytochrome *cd*₁-type nitrite reductase from the marine denitrifier *Pseudomonas nautica* 617: purification and characterization" *Anaerobe* **1**, 219.
- 35 Atack, J. M., Kel, D. J. (2007) "Structure, mechanism and physiological roles of bacterial cytochrome *c* peroxidase." *Adv Microb Physiol.* **52**, 73.
- 36 Hochman, A. (1993) "The diversity of bacterial hydroperoxidases." in *Plant Peroxidases: Biochemistry and physiology*, ed. Welinder, K. G., Rasmussen, S.K. Penel, C. Greppin, H. University Geneva.
- 37 Welinder, K. G., (1992) "Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase." *Curr Opin Struct Biol*, **2**, 388.
- 38 Goff, H. (1994) "Iron: Hemo Proteins, peroxidases & Catalases" in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 4, R.B. King (ed) John Wiley & Sons, LTD, England.
- 39 Bosshard, H., Anni, H., Yonetani, T., (1991) in *Peroxidases in Chemistry and Biology*, ed. Everse, J., Everse, K.E. e Grisham, M. B., 51-84. Boca Raton, CRC Press.
- 40 Goodhew, J., Wilson, I., Hunter, D., Pettigrew, G. (1990) "The cellular location and specificity of bacterial cytochrome *c* peroxidases." *Biochem. J.*, **271**, 707.
- 41 Foote, N., Turner, R., Brittain, T., Greenwood, C. (1992) "A quantitative model for the mechanism of action of the cytochrome *c* peroxidase of *Pseudomonas aeruginosa*" *Biochem. J.* **283**, 839.
- 42 Greenwood, C., Foote, N., Gadsby, P., Thomson, A. (1988) "A di-haem cytochrome *c* peroxidase (*Pseudomonas aeruginosa*). Its activation and catalytic cycle." *Chemica Scripta*

- 28 A, 79.
- 43 Fülöp, V., Ridout, C., Greenwood, C., Hajdu, J. (1995) "Crystal structure of the di-haem cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*" *Structure* **3**, 1225.
 - 44 Echalié, A., Brittain, T., Wright, J., Boycheva, S., Mortuza, G.B., Fulop, V., Watmough, N.J. (2008) "Redox-linked structural changes associated with the formation of a catalytically competent form of the diheme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **47**, 1947
 - 45 Pettigrew, G. W., (1991) "The cytochrome *c* peroxidase of *Paracoccus denitrificans*." *Biochim. Biophys. Acta* **1058**, 25.
 - 46 Gilmour, R., Goodhew, C., Pettigrew, G., Prazeres, S., Moura, J., Moura, I., (1993) "Spectroscopic characterization of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochem. J.* **294**, 745.
 - 47 Gilmour, R., Goodhew, C.F., Pettigrew, G.W., Prazeres, S., Moura, I., Moura J.J. (1994) "The kinetics of the oxidation of cytochrome *c* by *Paracoccus* cytochrome *c* peroxidase." *Biochem. J.* **300**, 907.
 - 48 Gilmour, R., Prazeres, S., McGinnity, D.F., Goodhew, C. F., Moura, I., Moura, J.J., Pettigrew, G. W., (1995) "The affinity and specificity of Ca²⁺-binding sites of cytochrome-*c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Eur. J. Biochem.* **234**, 878.
 - 49 McGinnity, D., Devreese, B., Prazeres, S., Beeumen, J. Moura, I., Moura, J. Pettigrew, G. (1996) "A single histidina is required for activity of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *J. Biol. Chem.* **271**, 11126.
 - 50 Lopes, H., Pettigrew, G., Moura, I., Moura, J.J., (1998) "Electrochemical study on cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*: a shifting pattern of structural and thermodynamic properties as the enzyme is activated." *J. Biol. Inorg. Chem.* **3**, 632.
 - 51 Pauleta, S., Guerlesquin, F., Goodhew, C., Devreese, B., Beeumen, J., Pereira, A., Moura, I., Pettigrew, G. (2004) "*Paracoccus pantotrophus* pseudoazurin is an electron donor to cytochrome *c* peroxidase." *Biochemistry* **43**, 11214.
 - 52 Pauleta, S., Cooper, A., Nutley, M., Errington, N., Harding, S., Guerlesquin, F., Goodhew, Moura, J., Moura, I., Pettigrew, G. (2004) "A copper protein and a cytochrome bind at the same site on bacterial cytochrome *c* peroxidase." *Biochemistry* **43**, 14566.
 - 53 Echalié, A., Goodhew, C., Pettigrew, G., Fulop, V. (2006), "Activation and catalysis of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus pantotrophus*." *Structure* **14**, 107
 - 54 Vollack, K., Härtig, E., Körner H., Zumft, W. (1999) "Multiple transcrip factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four fnr-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes" *Molecular microbiology*, **31**, 1681.
 - 55 Villalain, J., Moura, I., Liu, M., Payne, W., LeGall, J., Xavier, A., Moura J. (1984) "NMR and electron-paramagnetic-resonance studies of a dihaem cytochrome from *Pseudomonas stutzeri*." *Eur. J. Biochem* **141**, 305.
 - 56 Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdés, E., Palleroni, N. (2006) "Biology of *Pseudomonas stutzeri*" *Microbiology and molecular Biology Reviews*, **70**, 510.
 - 57 Bonifacio, C., Cunha, C.A., Muller, A., Timoteo, C., Dias, J., Moura, I., Romão M. J (2003) "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the di-haem cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas stutzeri*." *Acta Crystallogr. D. Biol: Crystallogr* **59**, 345.
 - 58 Timoteo, C., Tavares, P., Goodhew, C., Duarte, L., Jumel, K., Girio, F., Harding, S., Pettigrew, G., Moura, I., (2003) "Ca²⁺ and the bacterial peroxidases: the cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas stutzeri*" *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 29

- 59 Shimizu, H., Schuller, D., Lanzilotta, W., Sundaramoorthy, M., Arciero, D., Hooper, A., Poulos, T. (2001) "Crystal structure of *Nitrosomonas europaea* cytochrome *c* peroxidase and structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidase." *Biochemistry* **40**, 13483.
- 60 Arciero, D., Hooper, A., (1994) "A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced state." *J. Biol. Chem.* **269**, 11878.
- 61 Bradley, A., Chobot, S., Arciero, D., Hooper, A. t, S. (2004) "A distinctive electrocatalytic response from the cytochrome *c* peroxidase of *Nitrosomonas europaea*." *J. Biol. Chem.* **279**, 13297.
- 62 Elliott, S., Bradley, A., Arciero, D., e Hooper, A. (2007) "Protonation and inhibition of *Nitrosomonas europaea c* peroxidase observed with protein film voltammetry." *J. Inorg. Biochem.* **101**, 173.
- 63 De Smet, L., Pettigrew, G., Van Beeumen, J., (2001) "Cloning and characterization of cytochrome *c* peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*." *Eur. J. Biochem.* **268**, 6559.
- 64 De Wael, K., Buschop, H., Heering, H., Smet, L., Beeumen, J., Devreese, B., Adriaens, A. (2008) "Electrochemical determination of hydrogen peroxide using *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *c* peroxidase at a gold electrode" *Microchimica Acta* **162**, 65.
- 65 De Smet, L., Savvides, Van Horen, E., Pettigrew, G., Van Beeumen, J. (2006) "Structural and mutagenesis studies on the cytochrome *c* peroxidase from *Rodobacter capsulatus* provide new insights into structural- function relationships of bacterial di-heme peroxidase." *J. Biological Chemistry*, **281**, 4371.
- 66 Hanlon, S., Holt, R., McEwan, A. (1992) "The 44-kDa *c*-type cytochrome induced in *Rodobacter capsulatus* during growth with dimethylsulphoxide as an electron acceptor is a cytochrome *c* peroxidase." *FEMS Microbiology Letters* **97**, 283.
- 67 Kohl, M., Meyer, T., Smet, L., Beeumen, J., Cusanovich, M. (2003)"Characterization of the interaction of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *c* peroxidase with charge reversal mutants of cytochrome *c*₂." *Archives Biochemistry Biophysics* **410**, 230.
- 68 Karlsen, O., Kindingstad, L., Angelskar, S., Bruseth, L., Straume, D., Puntervoll, P., Fjellbirkeland, A., Lillehaug, J., Jensen, H. (2005) "Identification of a copper-repressible *c*-type heme protein of *Methylococcus capsulatus* (Bath). A member of a novel group of the bacterial di-heme cytochrome *c* peroxidase family of proteins." *FEBS Journal* **272**, 6324.
- 69 Zahn, J.A., Arciero, D. M., Hooper, A. B., Coats, J.R., DiSpirito, A.A., (1997) "Cytochrome *c* peroxidase from *Methylococcus capsulatus* bath." *Arch Microbiol* **168**, 362
- 70 Alves, T., Besson, S., Duarte, L., Pettigrew, G., Girio , F., Devreese, B., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Fauque, G. e Moura, I., (1999) "A cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617 active at high ionic strength: expression, purification and characterization." *Biochim. Biophys Acta* **1434**, 248.
- 71 Dias, J.M., Alves, T., Bonifácio, C., Pereira, A., Trincão, J., Bourgeois, D., Moura, I., Romão, M. J. (2004) "Structural basis for the mechanism of Ca²⁺ activation of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617." *Structure* **12**, 961.
- 72 Turner, S., Reid, E., Smith, H., Cole, J. (2003) "A novel cytochrome *c* peroxidase from *Neisseria gonorrhoeae*, a lipoprotein from a gram-negative bacterium." *Biochem J* **373**, 865.
- 73 Turner, S., Moir, J. W.B., Griffiths, L., Overton, T.W., Smith, H., Cole, J.A. (2005) "Mutational and biochemical analysis of cytochrome *c*', a nitric oxide-binding lipoprotein important for adaptation of *Neisseria gonorrhoeae* to oxygen-limited growth." *Biochem J*

- 388, 545.
- 74 **Karlsen, O., Larsen, Ø., Jensen, H.** (2010) "Identification of a bacterial di-haem cytochrome *c* peroxidase from *metylomicrobium album* BG8." *Microbiology* **156**, 2682
 - 75 **Hoffmann, M., Seidel, J., Einsle, O.** (2009) "CcpA from *Geobacter sulfurreducens* is a basic di-heme cytochrome *c* peroxidase" *J. Mol. Biol.* **393**, 951.
 - 76 **Ellis, K., Seidel, J., Einsle, O., Elliott, S.** (2011) "*Geobacter sulfurreducens* Cytochrome *c* Peroxidases: Electrochemical Classification of Catalytic Mechanisms." *Biochemistry*, **50** (21), 4513.
 - 77 **Pulcu, G., Frato, K., Gupta, R., Hsu, H-R., Levine, G., Hendrich, M., Elliot, S.** (2012) "The diheme cytochrome *c* Peroxidase from *Shewanella oneidensis* requires reductive activation." *Biochemistry* **51**, 974.
 - 78 **Schütz, B., Seidel, J., Sturm, G., Einsle, O., Gescher, J** (2011), "Investigation of the Electron Transport Chain to and the Catalytic Activity of the Diheme Cytochrome *c* Peroxidase CcpA of *Shewanella oneidensis*?", *Applied Environmental Microbiology*, **77**, 6172.
 - 79 **Sundararajan, A., Kurowski, J., Yan, T., Klingeman, M., Joachimiak, P., Zhou, J. Naranjo, B., Gralnick, A., Fields, M.,** (2011) "*Shewanella oneidensis* MR-1 Sensory Box Protein Involved in Aerobic and Anoxic Growth." *Applied Environmental Microbiology*, **77**, 4647
 - 80 **Ellis, k., Frato, K., Elliot, S.** (2012) "Impact of Quaternary Structure upon Bacterial Cytochrome *c* Peroxidases: Does Homodimerization Matter?" *Biochemistry*, **2012**, *51*, 10008.
 - 81 **Monteiro, R., Souza, E., Yates, G., Pedrosa, Fabio, Chubatsu, L.** (2003) "Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*." *Applied and environmental microbiology*, **69**, 1527.
 - 82 **Kucera, I., Mazoch, J.** (2002) "Control of gene expression by FNR-like Proteins in Facultative anaerobic bacteria." *Folia Microbiol* **47**, 95.
 - 83 **Van Spanning, R., De Boer, A., Reijnders, Spiro, S., Westerhoff, H., Stouthamer, A., Van Der Oost, J.** (1995) "Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators." *FEBS Letters* **360**, 15
 - 84 **Bouchal, P., Struhárová, I., Budinská, E., Sedo, O., Vyhliďalová, T., Zdráhal, Z., Van Spanning, R., Kucera I.** (2010) "Unraveling an FNR based regulatory circuit in *Paracoccus denitrificans* using a proteomics-based approach." *Biochimica Biophysica Acta* **1804**, 1350.
 - 85 **Backes, G., Mino, Y., Loehr, T., Meyer, T., Cusanovich, M., Sweeney, W., Adman, E., Sanders-Loeher, J.** (1991) "The environment of Fe₄S₄ clusters in Ferredoxins and high potential iron proteins. New information from X-Ray crystallography and resonance Raman spectroscopy." *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 2055.
 - 86 **Hutchings, M., Crack, J., Shearer, N., Thompson, B., Thomson, A., Spiro, S.** (2002) "Transcription Factor from *Paracoccus denitrificans* contain an Iron –Sulfur Cluster and is activated by anoxia: identification of essential cysteine residues." *Journal Bacteriology*, **184**, 503.
 - 87 **Becker, S., Holighaus, G., Gabrielczyk, T., Uden, G.** (1996) "O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*." *Journal Bacteriology*, **178**, 4515.
 - 88 **Crack, J., Green, J., Thomson, A.,** (2004) "Mechanism of Oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR)." *Journal Bacteriology*, **279**, 9278.

- 89 Zeilstra-Ryalls, Kelan, S. (2004) "Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm." *Celular Molecular Life Sciences*. **61**, 417.
- 90 Moore, L., Kiley, P., (2001) "Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor." *J biological Chemistry*, **276**, 45744.
- 91 Seib, K. L., Wu, Hsing-Ju, Kidd, S. P., Eicella, M.A., Jennings, M. P., McEwan, A.G. (2006) "Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment" *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 384.
- 92 Whitehead, R., Overton, T., Snyder, L., McGowan, S., Smith, H., Cole, J., Saunders, N. (2007) "The small FNR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*: comparison with the larger *Escherichia coli* FNR regulation with the NarQ-NarP regulon." *BMC Genomics* **8**, 35.
- 93 Winteler, H.V., Haas D. (1996) "The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters." *Microbiology* **142**, 685.
- 94 Williams, H. D., Ray, A. (1997) "The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiology Letters* **156**, 227.
- 95 Veldman, R., Reijnders, W., Van Spanning, R. (2006) "Specificity of FNR-type regulators in *Paracoccus denitrificans*." *Biochemical Society Transactions* **34**, 94.
- 96 Van Spanning, R., De Boer, A., Reijnders, W., Westerhoff, H., Stouthamer, A., Van Der Oost, J. (1997) "FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation." *Molecular microbiology* **13**, 893.
- 97 Pettigrew, G., Echaliier, A., Pauleta, S., (2006) "Structure and mechanism in the bacterial dihaem cytochrome *c* peroxidase" *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**, 551.
- 98 Sauders, N., Houben, E., Koefoed, S., Weert, S., Reijnders, W., Westerhoff, H., De Boer, A., Van Spanning, R (1999) "Transcription regulation of the *nir* gene cluster encoding nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* involves NNR and NirI, a novel type of membrane protein" *Molecular Microbiology*, **34**, 24.
- 99 Partridge, J., Poole, R., Green, J. (2007) "The *Escherichia coli* *yhjA* gene, encoding a predicted cytochrome *c* peroxidase, is regulated by FNR and OxyR." *Microbiology* **153**, 1499.
- 100 Grimaud, R., Ghiglione, J., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P., Rodriguez-Blanco, A., Mangelot, S., Cruveiller, S., Barbe, V., Duran, R., Wu, L., Talla, E., Bonin, P. e Michotey, V. (2012) "Genome Sequence of the Marine Bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, Which Forms Biofilms on Hydrophobic Organic Compounds" *J. Bacteriol.* **194**, 3539.
- 101 Zheng, M., Aslund, F. e G. Storz (1998). "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation." *Science* **279**:1718–1721.
- 102 Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., e Storz, G. (1999) "Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **25**:6161–6165.
- 103 Christman, M., Storz, G., e Ames, B (1989) "OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:3484–3488
- 104 Lee, C., Lee, S., Mukhopadhyay, P., Kim, S., Ahn, W-S., Yu, M-H., Storz, G., Ryu, S. "Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a third kinetic reaction path" *Nature structural & molecular biology*, **11**, 1179.
- 105 Choi, H-J., Kim, S., Mukhopadhyay, Cho, S., Woo, J-R., Storz; G., Ryu, S-E., (2001)

- “Structural basis of the redox switch in the OxyR Transcription Factor.” *Cell*. 105, 103.
- 106 Kim, S., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., Stamler, J. (2002) “OxyR: A Molecular Code for Redox-Related Signaling” *Cell*. 109, 383.
 - 107 Ochsner, U., Vasil, M., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K., Hassett, D. (2000) “Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG Operon in Oxidative Stress Defense and DNA Repair: OxyR-Dependent Regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF.” *Journal of Bacteriology* 182, 4533.
 - 108 Maddocks, S. E., and P. C. Oyston (2008).” Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins.” *Microbiology* 154:3609–3623.
 - 109 Italiani, V., Neto, J., Braz, V., Marques, M. (2011)“ Regulation of catalase-peroxidase katG is OxyR dependent and Fur independent in *caulobacter crescentus*” *J. Bacteriol.* 193, 1734.
 - 110 DhandayuthEani, S., Mudd, M., Deretic, V. (1997) “Interacts os OxyR with promoter region of the *oxyR* and *ahpC* Genes from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*” *Journal of bacteriology*, 179, 2401.
 - 111 Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M., Storz, G (1995) “Mutational analysis of the redox – sensitive transcriptional regulator oxyR: regions important for DNA binding and multimerization” *Journal of bacteriology*, 177, 1285.
 - 112 Toledano, M., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P., Schneider, T., Storz, G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an ex-tended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection” *Cell* 78, 897
 - 113 Richard-Fogal, C., Kranz, R. (2010) “The CcmC:heme:CcmE complex in heme trafficking and cytochrome c biosynthesis.” *Journal of molecular biology* 401, 350.
 - 114 Sanders. C.Turkarlan, S., Lee, Dong-Woo., Daldal, F. (2010) “Cytochrome c biogenesis: the Ccm system, *Trends Microbiol.*, 18, 266.
 - 115 Page, M., Pearce, D., Norris, H. (1997) “The *Paracoccus denitrificans* ccmA, B and C genes : cloning and sequencing, and analysis of the potencial of their products to form a haem or apo-c-type cytochrome transporter”. *Microbiology*, 143, 563.
 - 116 Page, M., Fergunson, S. (1999) “Mutational analysis of *Paracoccus denitrifcans* c-type cytochrome biosynthetic genes *ccmABCDG*: disruption of *ccmC* has distinct effects suggesting a role for CcmC independent os CCmAB.” *Microbiology*, 145, 3047.
 - 117 Sanders,C., Deshmukh, M., Astor,D., Kranz,R., Daldal, F. (2005) Overproduction of CcmG and CcmFHRc Fully Suppresses the c-Type Cytochrome Biogenesis Defect of *Rhodobacter capsulatus* CcmI-Null Mutants” *Journal of Bacteriology*, 187, 4245
 - 118 Pugsley, A., (1993)“The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria” *Microbiological reviews*, 57, 50.
 - 119 Thöny-Meyer, L. (1997) “Biogenesis of respiratory cytochromes in bactéria” *Microbiology and molecular biology reviews*, 61, 337.
 - 120 Petersen T., Brunak S., Von Heijne, G. e Nielsen H. (2011) “SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.” *Nature Methods*, 8:785.
 - 121 Ronnberg, M., Ellfolk, N. (1979) “Heme-linked properties of *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase. Evidence for non-equivalence of the hemes.” *Biochim Biophys Acta* 581, 325.
 - 122 Ellfolk, N., Ronnberg, M., Aasa, R., Andréasson, Vanngard, T., (1983) “Properties and function of the two hemes in *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase.” *Biochim. Biophys. Acta* 743, 23.
 - 123 Ellfolk, N., Ronnberg, M., Aasa, R., Vanngard, T., Angstrom, J. (1984) “Spin states of and interactions between the hemes of *Pseudomonas* cyto-chrome c peroxidase: Evidence

- from proton NMR and cyanide binding studies." *Biochim Biophys Acta* **791**, 9
- 124 Ellfok, N., Ronnberg, M., Aasa, R., Andréasson, Vanngard, T. (1984) "Spin states and interaction between the hemes of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase." *Biochim. Biophys. Acta* **784**, 62.
 - 125 Moore, G., Pettigrew, G., (1990) in Cytochromes *c*: Evolutionary Structural and Physical Aspects, Springe-Verlag, Germany.
 - 126 Pauleta, S., Lu-Yi, Goodhew, C., Moura, I., Pettigrew, G., Shelnutt, J. (2008) "Calcium-dependent heme structure in the reduced forms of the bacterial cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus pantotrophus*", *Biochemistry*, **47**, 5841.
 - 127 Rosenfeld, R., Hays, A-M., Musah, R., Goodin, D., (2002) "Excision of a proposed electron transference pathway in cytochrome *c* peroxidase and its replacement by a ligand-binding channel." *Protein Science* **11**, 1251.
 - 128 Foote, N., Peterson, J., Gadsby, P., Greenwood, C., and Thomson, A. (1985) "Redox-linked spin-state changes in the di-haem cytochrome *c*-551 peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochem. J.* **230**, 227.
 - 129 Korsun, Z., Moffat, K., Frank, K., Cusanovich, M., (1982) "Extended X-ray absorption fine structure studies of cytochromes *c*: structural aspects of oxidation-reduction." *Biochemistry* **21**, 2253
 - 130 Becker, C. F., Watmough, N. J., Elliott, J. S. (2009) "Electrochemical Evidence for Multiple Peroxidatic Heme States of the Diheme Cytochrome *c* Peroxidase of *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **48**, 87.
 - 131 Prazeres, S., Moura, J., Moura, I., Gilmour, R., Goodhew, C., Pettigrew, G., Ravi, N., Huynh, B., (1995) "Mossbauer characterization of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* peroxidase. Further evidence for redox and calcium binding-induced heme-heme interaction" *J. Biol. Chem.* **270**, 24264
 - 132 Aasa, R. Vännngard, T. (1975) "EPR signal intensity and powder shapes. Reexamination" *J. Mag. Res.* **19**, 308.
 - 133 Taylor, C. (1977) "The EPR of low spin heme complexes Relation of the τ_{2g} hole model to the directional properties of the *g* tensor, and a new method for calculating the ligand field parameters." *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 137.
 - 134 Gibson, J. (1979) "EPR of Iron in biological system" in Paramagnetic species in biological and related systems, Bertini, I. Drago, R.S. (eds), Reidel Publishing Company, London.
 - 135 Gadsby, P., Thompson, A. (1986) "Low-temperature EPR and near-infrared MCD studies of highly anisotropic low-spin ferrihaem complexes." *FEBS Lett.* **197**, 253.
 - 136 Palmer, G. (1985) "The electron paramagnetic resonance of metalloproteins." *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 548.
 - 137 Wertz, J., Bolton, J. (1986) in Electron Spin resonance, Elementary Theory and practical applications, McGraw-Hill, New York.
 - 138 Walker F., Huynh, B., Scheidt, W., Osvath, S. (1986) "Models of the cytochromes *b*. Effect of axial ligand plane orientation on the EPR and Mossbauer spectra of low-spin ferrihemes." *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5288.
 - 139 Moore, C., Gayda, J., Bertrand, P. (1990) "Simulations of the *g*-strain broadening of low-spin hemoprotein EPR spectra based on the t_{2g} hole model." *J. Mag. Res.* **90**, 486.
 - 140 Saraiva, L., Besson, S., Moura, I., Fauque, G., (1995) "Purification and preliminary characterization of three *c*-type cytochromes from *Pseudomonas* function strain 617." *Biochemical Biophysical Research Communications* **212**, 1088.
 - 141 Li, J., Darrouzet, E., Dhawan, I., Johnson, K., Osyczka, A., Daldal, F., Knaff, D. (2002) "Spectroscopic and oxidation –reduction properties of *Rhodobacter capsulatus*

- cytochrome c_1 and its M183K and M183H variants” *Biochimica et Biophysica Acta* 1556, 175.
- 142 Gayda, J., Yagi, T., Benosman, H., Bertrand, P. (1987) “EPR redox study of cytochromes c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki”. *FEBS LETTERS* **217**, 57.
 - 143 Moore, G. (1985) “ ^1H -NMR studies of the haem and coordinated methionine of Class I and Class II cytochromes c ” *Biochem. Biophys. Acta* **829**, 425.
 - 144 Bertini, I., Luchinat, C. (1986) in *NMR of Paramagnetic molecules in Biological Systems*, Physics Bioinorganic Chemistry Series, Benjamin Cummings Publishing Company. Inc. U.K.
 - 145 Wüthrich, K., Keller, R. (1986) in *NMR of Protein and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, Inc.
 - 146 Levine, B., Moore, G., Ratcliffe, R., Williams, R. (1979) *Nuclear Magnetic Resonance Studies of the solution structure of proteins*, in *Chemistry of macromolecules IIA*, 24, University Park Press, Baltimore.
 - 147 Sanders, J., Hunter, B. (1987) in *Modern NMR spectroscopy, a Guide for chemistry*, Oxford University Press, Oxford.
 - 148 Gil, V., Geraldes, C. (1987) in *Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, Métodos e aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
 - 149 Lambert, J., Mazzola, E. (2002) in *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. An introduction of principles applications, and experimental methods*, Pearson, New Jersey
 - 150 Moura, I., Ming, C-Liu., LeGall, J., Peck, H., Payne, W., Xavier, A., Moura, J. (1984), “NMR studies of a dihaem cytochrom from *Pseudomonas perfectomarinus* (ATCC14405)” *Eur. J. Biochem.* **141**, 297.
 - 151 Gadsby, P., Hartshorn, R., Moura, J., Sinclair-Day, J., Sykes, G., Thomson, A. (1989) “Redox properties of the dihaem cytochrome c_4 from *Azotobacter vinelandii* and characterisation of the two hemes by NMR, MCD and EPR spectroscopy.” *Biochim. Biophys. Acta* **994**, 37.
 - 152 Smith, G., Yu, L. (1991) “High-resolution ^1H - and ^{15}N -NMR studies of *Rhodospirillum rubrum* cytochrome c_2 .” *Biochem. Biophys. Acta*, **1058**, 75.
 - 153 Araiso, T., Ronnberg, M., Dunford, H., Ellfok, N. (1980) “The formation of the primary compound from hydrogen peroxide and pseudomonas cytochrome c peroxidase” *FEBS Lett.* **118**, 99
 - 154 Ronnberg, M., Araiso, T., Ellfok, N., Dunford, H. B. (1981) “The catalytic mechanism of *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase” *Arch. Biochem. Biophys.* **207**, 197.
 - 155 Kim, N., Jeong, M., Choi, S., Kang, J. (2004) “Peroxidase activity of cytochrome c ” *Bull. Korean Chem. Soc.* **25**, 1889.
 - 156 Kim, N., Kang, J. (2006) “Oxidative damage of DNA induced by the cytochrome c and hydrogen Peroxide system” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 452.
 - 157 Valderrama, B., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R. (2002) “Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes” *Chemistry & Biology*, **9**, 555–565.
 - 158 Dequaire, M., Limoges, B., Moiroux, J., Savéant, J. (2002) “Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition.” *J. Am. Chem Soc.* **124**, 240
 - 159 Paes de Sousa, P., Pauleta, S., Simões Gonçalves, G., Pettigrew, G., Moura, I., Correia dos Santos, M., Moura, J. (2007), “Mediated catalysis of *Paracoccus pantotrophus* cytochrome c peroxidase by *P. Pantotrophus* pseudoazurin: kinetics of intermolecular electron transfer.” *J. Biol. Inorg. Chemistry* **44**, 76.
 - 160 H. Fu (2003), Protein–Protein Interactions: Methods and Protocols in *Methods in molecular*

- bioloy vol. **261**, Edited by: H. Fu © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- 161 **Soininen, R., Ellfolk, N.** (1972) "Pseudomonas cytochrome *c* peroxidase IV. Some kinetics properties of the peroxidations reaction, and enzymatic determination of the extinction coefficients of Pseudomonas cytochrome *c*-551 and azurin." *Acta Chem Scand* **26**, 861.
 - 162 **Fauque, G., Moura, J.J. G., Besson, S., L.M., Moura, I.,** (1992) "Caractérisation préliminaire du système cytochromique de la bactérie marine dénitrifiante *Pseudomonas nautica*." *Océanis* **18**
 - 163 **Brown, K., Nurizzo, D., Besson, S., Shepard, W., Moura, J., Moura, I., Tegoni, J.,** (1999) "MAD structure of *Pseudomonas nautica* dimeric cytochrome *c*₅₅₂ mimicks the *c*₄ dihemic cytochrome domain association." *J. Mol. Biol.* **289**, 1017.
 - 164 **Correia dos Santos, M., de Sousa, P., Simões Gonçalves, M., Krippahl, L., Moura, J., Lojou, É., Bianco, P.** (2003), "Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes" *J. Electroanalytical Chemistry* **541**, 153.
 - 165 **Saraiva, L., Fauque, G., Besson, S., Moura, I.,** (1994) "Physico-chemical and spectroscopic properties of the monohemic cytochrome *c*₅₅₂ from *Pseudomonas nautica* 617." *Eur. J. Biochem.* **224**, 1011.
 - 166 **Dell'Acqua, Simone, Pauleta, S., Monzani, E., Pereira, A., Casella, L., Moura, J., Moura, I** (2008) "Electron transfer complex between Nitrous oxide reductase and cytochrome *c*₅₅₂ from *Pseudomonas nautica*: Kinetics, nuclear Magnetic Resonance, and docking studies" *Biochemistry* **47**, 10852.
 - 167 **Lopes, H., Besson, S., Moura, I., Moura, J.J.,** (2001) "Kinetics of inter- and intramolecular electron transfer of *Pseudomonas nautica* 617 cytochrome cd1 nitrite reductase, regulation of the NO-bound end product." *Biol. Inorg. Chem.* **6**, 55.
 - 168 **Jiménez, H., Pardal, C., Moratal, J.** (2005) ¹H RMN studies of paramagnetic ferricytochrome *c*-551 from *Pseudomonas aeruginosa* at high pH: The role of histidine 16 in the spin transition" *Polyhedron* **24** 1813.
 - 169 **Correia dos Santos, M., Paes de Sousa, P., Gonçalves, M., Lopes, H., Moura, I., Moura, J,** (1999) "Electrochemical studies on *c*-type cytochromes at microelectrodes.", *Journal of Electroanalytical Chemistry* **464**, 76.
 - 170 **Rivas, L., Murgida, D., Hildebrandt, P.** (2002) "Conformational and redox equilibria and dynamics of cytochrome *c* immobilized on electrodes via hydrophobic interactions" *J. Phys. Chem B*, **106**, 4823
 - 171 **Bianco, P., K Lojou, É.** (2000) "Membrane electrodes can modulate the electrochemical response of redox proteins - direct electrochemistry of cytochrome *c*" *Journal electrochemical Chemistry* **485**, 71.
 - 172 **Moore, G., Huang, Z-X., Eley, C., Barker, H., Williams, G., Robert, R., Williams, J.,** (1982), "Electron Transfere in Biology. The function of cytochrome *c*" *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **74**, 311.
 - 173 **Battistuzzi, G., Borsari, M., Sola, M., Francia, F.** (1997) "Redox thermodynamics of the native and alkaline forms of eukaryotic and bacterial class I cytochromes *c*." *Biochemistry*, **36**, 16247
 - 174 **Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Sola, M.; Francia, F.** (1999) "Thermodynamics of the alkaline transition of cytochrome *c*" *Biochemistry*, **38**, 7900.
 - 175 **Koppenol, W., Vroonland, C., Braams, R.** (1978) "The electric potential field around cytochrome *c* and the effect of ionic strength on reaction rates of horse cytochrome *c*." *Biochim. Biophys. Acta.* **503**, 499.
 - 176 **Petrovic, J.; Clark, R. A.; Yue, H.; Waldeck, D. H.; Bowden, E. F.** (2005) "Impact of

- surface immobilization and solution ionic strength on the formal potential of immobilized cytochrome *c*." *Langmuir*, **21**, 6308
- 177 Gadsby, P., Peterson, J., Foote, N., Greenwood, C., Thomson, A., (1987) "Identification of the ligand-exchange process in the alkaline transition of horse heart cytochrome *c*." *Biochem. J.* **246**, 43
 - 178 Janin, J., (1995) "Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics." *Biochimie.* **77**, 497.
 - 179 Rodgers, K., Sligar, S. (1991) "Mapping electrostatic interactions in macromolecular associations." *J. Mol. Biol.* **221**, 1125.
 - 180 Bendall, D., (1996) in Protein electron transfer (Bendall, D. S., eds), BIOS Scientific Publisher Ltd, Oxford, 43.
 - 181 Ofra, Y., Rost, B. (2003) "Analyzing six types of protein-protein interfaces." *J Mol Biol.* **10**, 377.
 - 182 Bashir, Q., Scanu, S., Ubbink, M. (2011) "Dynamics in electron transfer protein complexes" *FEBS Journal* **278**, 1391.
 - 183 Marcus, R., Sutin, N. (1985) "Electron transfer in chemistry and biology." *Biochim, biophys Acta* **811**, 265.
 - 184 Davidson, V. (2000) "What controls the rates of interprotein electron-transfer reactions?" *Acc. Chem. Res.* **33**, 87.
 - 185 Kundrotas, P., Alexov, E. (2006) "Electrostatic properties of protein-protein complexes." *Biophysical Journal* **91** 1724.
 - 186 Nooren, I., Thornton, J. (2003) "Structural functionalities and functional significance of transient protein-protein interactions." *J. Mol. Biology* **325**, 991.
 - 187 Chotia, C., Janin, J., (1975) "Principles of protein-protein recognition." *Nature* **256**, 705
 - 188 Selzer, T., Schreiber, G. (2001) "New insights into the mechanism of protein-protein association." *Proteins.* **45**, 190.
 - 189 Díaz-Moreno, I., De La Rosa, M. (2011) "Transient interactions in metalloproteins." *FEBS Journal* **278**, 1381.
 - 190 Lo Conte, L., Chothia, C., Janin, J. (1999) "The atomic structure of protein-protein recognition sites." *J. Mol. Biol.* **285**, 2177.
 - 191 Page, C., Moser, C., Dutton, P. (2003) "Mechanism for electron transfer within and between proteins." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 551.
 - 192 Marcus, R. (1956) "The theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer" *J. Chem. Phys.* **24**, 966
 - 193 Zhou, Nandi, Cao, Y., Li, Genxi. (2010) "Electron transfer and interfacial behavior of redox proteins" reviews, *Science China chemistry*, **53**, 720.
 - 194 Volkov, A., Worrall, J., Holtzmann, E., Ubbink, M. (2006) "Solution structure and dynamics of the complex between cytochrome *c* and cytochrome *c* peroxidase determined by paramagnetic NMR." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 18945.
 - 195 Lian, L., Barsukov, I., Sutcliffe, M., Sze, K., Roberts, G. (1994). "Protein-ligand interactions: exchange processes and determination of ligand conformation and protein-ligand contacts." *Methods in Enzymology* **239**, 657.
 - 196 Fielding, L. (2007) "NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants." *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **51**, 219.
 - 197 Pettigrew, G., Prazeres, S., Costa, C., Palma, N., Kripphal, L., Moura, I., Moura, J., (1999) "The structure of an electron transfer complex containing a cytochrome *c* and a peroxidase." *J. Biol. Chem.* **274**, 11383.
 - 198 Crowley, P., Ubbink, M., (2003) "Close encounters of the transient kind: protein

- interactions in the photosynthetic redox chain investigated by NMR spectroscopy." *Acc. Chem. Res.* **36**, 723.
- 199 **Moreira, I., Fernandes, P., Ramos, M.** (2010) "Protein-protein docking dealing with the unknown." *J Comput Chem* **31**, 317
 - 200 **Palma, P., Krippahl, L., Wampler, J., Moura, J.** (2000) "A new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions." *Proteins*. **39**, 372
 - 201 **Krippahl, L., Wampler, J., Moura, J. Palma, P.** (2000) "Modeling proteins complexes with BiGGER"
 - 202 **Camacho, C., Vajda, S.** (2002) "Protein-protein association kinetics and protein docking." *Curr. Op. Struct. Biol.* **12**, 36.
 - 203 **Juettemann, T., Gerloff, D.,** (2011) "BISC: Binary Sub Complexes in proteins database." *Nucleic Acids Research* **39**, D705.
 - 204 **Smith, G., Sternberg, M.** (2002) "Prediction of protein-protein interactions by docking methods." *Curr. Op. Struct. Biol.* **12**, 28.
 - 205 **Pettigrew, G., Gilmour, R., Goodhew, D., Hunter, B., Devreese, J., Van Beemen, Costa, C. Prazeres, S., Krippahl, L., Palma, P., Moura, I., Moura, J.,** (1998) "The surface-charge asymmetry and dimerization of cytochrome *c*₅₅₀ from *Paracoccus denitrificans* – implications for the interaction with cytochrome *c* peroxidase." *Eur. J. Biochem.* **258**, 559.
 - 206 **Pettigrew, G., Pauleta, S., Goodhew, C., Cooper, A., Nutley, M., Jumel, K., Harding, S.** (2003) "The electron transfer complexes of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochemistry*, **42**, 2046..
 - 207 **Pelletier H., Kraut, J.** (1992) "Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*." *Science* **258**, 1748.
 - 208 **Guo, M., Bhaskar, B., Li, H., Barrows, T., Poulos, T.** (2004) "Crystal structure and characterization of a cytochrome *c* peroxidase – cytochrome *c* site-specific cross-link." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 5940.
 - 209 **Dell'Acqua, S., Moura, I., Moura, J., Pauleta, S.** (2011) "The electron transfer complex between nitrous oxide reductase and its electron donors" *J Biol Inorg Chem*
 - 210 **Williams, P., Fulop, V., Leung, Y., Chan, C., Moir, J., Howlett, G., Ferguson, S., Radford, S., Hajdu, J.** (1995) "Pseudospecific docking surfaces on electron transfer proteins as illustrated by pseudoazurin, cytochrome *c*₅₅₀ and cytochrome *cd1* nitrite reductase." *Nat. Struct. Biol.* **2**, 975.
 - 211 **Lojou, E., Cutruzzola, Tegoni, M., Bianco, P.** (2003) "Electrochemical study of the intermolecular electron transfer to *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *cd1* nitrite reductase" *Electrochimica Acta*, **48**, 1055.
 - 212 **Bonin, P., Gilewicz, M., Bertrand, J.** (1987) "Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617." *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **138**, 371.
 - 213 **Bonin, P., Bertrand, J., Giordano, G., Gilewicz, M.,** (1987) Specific sodium dependence of a nitrate reductase in a marine bacterium." *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 5.
 - 214 **Gauthier, M., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.** (1992) "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium." *Int. J. Syst Bacteriol.* **42**, 568.-
 - 215 **Sproer, C., Hobeck, P., Burghardt, J., Stackebrandt, E., Tindall, B.** (1998) "Transfer of *Pseudomonas* function to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*." *Int. J. Sist. Bacteriol.* **48**, 1445.
 - 216 **Starkey, R.** (1938) "A study of spore formation and other morphological characteristics of *Vibrio desulfuricans*" *Arch. Microbiol.* **8**, 238.

- 217 Laemmli, U. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680
- 218 Goodhew, C., Brown, K., Pettigrew, G. (1986) "Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes". *Biochim. Biophys. Acta* **852**, 288.
- 219 Moffet, D., Foley, J., Hecht, M. (2003) "Midpoint reduction potentials and heme binding stoichiometries of de novo from designed combinatorial libraries." *Biophysical chemistry* **105**, 231.
- 220 Martin-Campos, J., Blanco-Brieva, G., Fierro, J. (2006) "Hydrogen Peroxide synthesis: An Outlook beyond the antraquinone process" *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 6962.
- 221 Simpson, H., Denis, M., Malatesta, F. (1997) "The Terminal Oxidase in the Marine Bacterium *Pseudomonas nautica* 617." *Bioscience Reports*, **17**, 343.
- 222 Arnaud, S., Malatesta, F., Guigliacelli, B., Gayda, J., Bertrand, P., Miraglio, R., Denis, M. (1991) "Purification and characterization of the oxidase from the marine bacterium *Pseudomonas nautica* 617" *Eur. J. Biochem.* **198**, 349.
- 223 Reis, Louro., R, Pacheco, I., Catarino, T., Turner, D., Xavier, A. (2002) "Redox - bohr effect in nine haem cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* 27774." *Inorganica Acta* **339**, 248.
- 224 Pea, S., Ceitanio, N. (1998) "Redox bohr effects (cooperative coupling) and the role of heme a in the Proton Pump of cytochrome c oxidase" *Journal Bioenergetics and biomembranes*, **30**, 110.
- 225 Enguita, F., Pohl, E., Turner, D., Santos, H., Carrondo, A. (2006) "Structural evidence for a proton transfer pathway coupled with haem reduction of cytochrome c' from *Methylophilus methylotrophus*" *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 189.
- 226 Morgado, L., Bruix, M., Pessanha, M., Y., Salgueiro, C. (2010) "Thermodynamic characterization of a triheme cytochrome family from *Geobacter sulfurreducens* reveals mechanistic and functional diversity." *Biophysical Journal*, **99**, 293.
- 227 Moore, G. R., Pettigrew, G.W., (1990) in Cytochromes c: Evolution, Structural and Physicochemical Aspects. Springer-Verlag, Heidelberg..
- 228 Bartalesi, I., Bertini, I., Rosato, A. (2003), "Structure and dynamics of reduced *Bacillus pasteurii* cytochrome c: oxidation state dependent properties and implications for electron transfer processes." *Biochemistry* **42**, 739.
- 229 Wütrich, K., Senn, H. (1983) "A new spatial structure for the axial methionine observed in c₅ from *Pseudomonas mendocina*: correlations with the electronic structure of heme c" *Biochim. Biophys. Acta* **747**, 16.
- 230 Armstrong, F., Cox, P., Hill, H., Lowe, V., Oliver, B. (1987) "Metal ions and complexes as modulators of protein-interfacial electron transport at graphite electrodes." *J Electroanal Chem* **217**, 331.
- 231 Armstrong, F., Hill, H., Walton, N. (1988) "Direct electrochemistry of redox proteins" *Acc. Chem. Res.* **21**, 407.
- 232 Armstrong, F., Heering, H., Hirst, J. (1997) "Reactions of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry" *Chemistry Society Reviews*, **26**, 169.
- 233 Armstrong, F., Jeuken, L., McEvoy, J. (2002) "Insights into Gated Electron-Transfer Kinetics at the Electrode-Protein Interface: A Square Wave Voltammetry Study of the Blue Copper Protein Azurin." *J Phys Chem. B.* **106**, 2304.
- 234 Rusling, J., Wang, B., Yun, S. (2008) "Electrochemistry of Redox Enzymes" in Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications Ed. Philip Bartlett.
- 235 Bartlett, P. (2008) in Bioelectrochemistry. Fundamentals, Experimental Techniques and

- Applications, John Wiley & Sons, Ltd. Eds.
- 236 **Butt, J., Armstrong, F.** (2008) "Voltammetry of adsorbed redox enzymes: mechanism in the potential dimension." In Bioinorganic Electrochemistry Springer eds, CE. 4, 91
 - 237 **Kim, B., e Lovley, D.** (2008) "Investigation of direct vs. indirect involvement of the *c*-type cytochrome MacA in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*." *FEMS Microbiol. Lett.* **286**, 39
 - 238 **Murgida, D., Hildebrandt, P** (2005)"Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces." *Phys Chem Chem Phys* **7**, 3773.
 - 239 **Blanford, C., Armstrong, F.** (2006) "The pyrolytic graphite surface as an enzyme substrate: microscopic and spectroscopic studies." *J. Solid State Electrochem.* **10**, 826.
 - 240 **Leger, C., Bertrand, P.** (2008) "Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanism studies." *Chemical Reviews*, **108** (7) 2379
 - 241 **Laviron, E.**, (1982) "Voltammetric Methods for the study of adsorbed species." in Electrochemical chemistry, Vol. 12, Bard, A. J., (Eds)., Marcel Dekker, Inc., New York.
 - 242 **Oliveira Brett, A., Brett, C.** (eds.), *Electrochemistry. Principles, methods and applications*. Oxford University Press, Oxford, 1993, cap 9 e 10.
 - 243 **Gonçalves, M.L.S.S.** (1991) in Métodos instrumentais para análise de soluções (2nd Eds) Fundação Calouste Gulbenkian.
 - 244 **Bard, A., Faulkner, L.** (2001) in Electrochemical methods, Fundamentals and applications, 2º ed, Wiley, New York
 - 245 **Paes de Sousa, P., Pauleta, S., Simões Gonçalves, G., Pettigrew, G., Moura, I., Correia dos Santos, M., Moura, J.** (2011), "Artefacts induced on c-type haem proteins by electrode surfaces." *J. Biol. Inorg. Chemistry* **16**, 209
 - 246 **Teixeira, V., Baptista, A., Soares, C.** (2004) "Modelling electron transfer thermodynamics in protein complexes: interaction between two cytochromes c_3 " *Biophysical Journal* **86**, 2773.
 - 247 **Oellerich S, Wackbarth H, Hildebrandt P.** (2002) "Spectroscopic characterization of nonnative conformational states of cytochrome *c*." *J. Phys. Chem. B.* 106, 6566.
 - 248 **Wackbarth, H., Hildebrandt, P** (2003)"Redox and conformational equilibria dynamics of cytochrome *c* at high electric fields" *Chemphyschem*, **4**, 714.
 - 249 **Murgida, D., Hildebrandt, P** (2004) "Electron-transfer processes of cytochrome *c* at interfaces. New insights by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy. *Acc. Chem Res* **37**, 854
 - 250 **De Biase, P., Paggi, D., Doctorovich, F., Hildebrandt, P., Estrin, D., Murgida, D., Marti, M.** (2009) "Molecular basis for the electric field modulation of cytochrome *c* structure and function." *J. Am Chem Soc* **131**, 16248.
 - 251 **Ly, H., Sezer, M., Wisitruangsakul, N., Feng, J-J., Kranich, A., Millo, D., Weidinger, I., Zebger, I., Murgida, D., Hildebrandt P.** (2011) "Surface enhance vibrational spectroscopy for probing transient interactions of proteins with biomimetic interfaces: Electric fields effects on structure, dynamics and function of cytochromes *c*" *FEBS Journal*
 - 252 **Khoa, H., Sezer, M., Wisitruangsakul, N., Feng, J-J., Kranich, A., Millo, D., Weinding, I., Zebger, I., Murgida, D., Hildebrandt, P.** (2011) "Surface-enhanced vibrational spectroscopy for probing transient interactions of proteins with biomimetic interfaces: electric field effects on structure, dynamics and function of cytochrome *c*" *FEBS Journal* **278**, 1382
 - 253 **Paes de Sousa, P., Rodrigues, D., Timoteo, C., Simões Gonçalves, G., Pettigrew, G., Moura, I., Correia dos Santos, M., Moura, J.** (2011) "Analysis of the activation mechanism of *Pseudomonas stutzeri* cytochrome *c* peroxidase through an electron transfer

- chain. " *J Biol InorgSA Chem*, **16**, 881.
- 254 **Nicholson, R., Shain, I.** (1964) "Theory of Stationary Electrode polarography. Single Scan and Cyclic Methods applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems" *Anal. Chem.* **36**, 706
 - 255 **Paes de Sousa, P., Pauleta, S., Rodrigues, D., Gonçalves, S., Pettigrew, G., Moura, I., Moura, J., Correia Santos, M.** (2008) "Benefits of membrane electrodes in electrochemistry of metalloproteins: mediated catalysis of *Paracoccus pantotrophus* cytochrome *c* peroxidase by cytochrome *c*: a case study" *J. Biol. Inorg. Chem.*,
 - 256 **Leitch, F., Moore, G., Pettigrew, G** (1984) "Structural basis for the variation of pH dependent redox potentials of *Pseudomonas* cytochrome *c*₅₅₁" *Biochemistry* **23**, 1831.
 - 257 **Cusanovich, M., Caffrey, M.** (1991) "Biological electron transfer: progress and future directions." *Biochim. Biophys. Acta.* **1058**, 67
 - 258 **Mayo, S., Ellis, Jr., Crutchley, R., Gray, H.** (1986) "Long-range electron transfer in heme proteins." *Science.* **233**, 948.
 - 259 **Costa, H., Santos, H., Turner, D., Xavier, A.** (1992) "Involvement of a labile axial histidine in coupling electron and proton transfer in *Methylophilus methylotrophus* cytochrome *c*"', *Eur. J. Biochem.* **208**, 427
 - 260 **Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C., Di Rocco, G., Leonardi, A., Sola, M.** (2004) "Characterization of the solution reactivity of a basic heme from *Cucumis sativus*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **423**, 317.
 - 261 **Papadopoulou, K., Markantonatou, V, Smith, C.** (2011) "The Mediterranean Sea: Additional information on status of threatened ecological characteristics relevant to the strategy framework directive" European Commission's 7th frame project "Options for delivering ecosystem-based marine management (ODEMM, Theme ENV.2009.2.2.1.1)
 - 262 **De la Rosa, M., Navarro, J., Díaz-Quintana, A., De la Cerda, B., Molina-Heredia, F., Balme, A., Murdoch, P., Díaz-Moreno, I., Durán, R., Hervás, M.,** (2002) "An evolutionary analysis of the reaction mechanisms of photosystem I reduction by cytochrome *c*(6) and plastocyanin." *Bioelectrochemistry* **55**,
 - 263 **Kühlman, U., Pommer, A., Moore, G., James, R., Kleanthous, C.** (2000) "Specificity in protein-protein interactions: the structural basis for dual recognition in endonuclease colicin-immunity protein complexes." *J. Mol. Biol.* **301**, 1163.
 - 264 **Hervás, M., Navarro, J., Díaz, A., Bottin, H., De la Rosa, M.A.,** (1995) "Laser-flash kinetic analysis of the fast electron transfer from plastocyanin and cytochrome *c*6 to photosystem I. Experimental evidence on the evolution of the reaction mechanism." *Biochemistry* **34**, 11321.
 - 265 **Maneg, O., Ludwig, B., Malatesta, F.** (2003) "Different interactions modes of two cytochrome-*c* oxidase soluble CuA fragments with their substrates" *J. Biological Chemistry*, **278**, 46734
 - 266 **Gooley, P., Caffrey, M. , Cusanovich, M., Mackenzie, N.** (1992) "Mutations Pro--Ala-35 and Tyr--Phe-75 of *Rhodobacter capsulatus* ferrocycytochrome *c*₂ affect protein backbone dynamics: measurements of individual amide proton exchange rate constants by 1H-15N HMQC spectroscopy." *Biochemistry* **31**, 443
 - 267 **Ducluzeau, A., van Lis R., Duval. S., Schoepp- Cothenet B., Russel, M., Nitschke, W.** (2009) "Was nitric oxide the first deep electron sink?" *Trends Biochem Sci.* **34**, 9.
 - 268 **Slesak, I., Slesak, H., Kruk, J** (2012) "Oxygen and Hydrogen Peroxide in the Early Evolution of Life on Earth: In silico Comparative Analysis of Biochemical Pathways" *Astrobiology*, **12**, 775.